

**UNTERSUCHUNG ZUR SELEKTIVEN DARSTELLUNG
DER ZELLEN DER LANGERHANS'SCHEN INSELN
CORTISON- UND ACTH-WIRKUNGEN AUF DAS INSELSYSTEM**

von

Harald Hoffmann

aus

Karlsbad

1973 # 458

Aus dem Anatomischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. K. F. Bauer

UNTERSUCHUNG ZUR SELEKTIVEN DARSTELLUNG DER ZELLEN DER LANGERHANS'SCHEN INSELN

CORTISON- UND ACTH-WIRKUNGEN AUF DAS INSELSYSTEM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Harald Hoffmann

aus

Karlsbad

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg.



Dekan: Professor Dr. Dr. H. Pauly
Referent: Professor Dr. U. Merkle
Koreferent: Professor Dr. K. Fr. Bauer
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 1973

GLIEDERUNG

EINLEITUNG	1
I. FÄRBUNG	1
- Nomenklatur der Inselzellen	
- Zielsetzung	
II. VERSUCHSTIERE	3
- Regulierung der Insulinsekretion	
MATERIAL UND METHODIK	5
I. FÄRBUNGEN nach	5
1. Fisher et al. (25)	
2. Mann (Romeis (76, § 723))	
3. Bock et al. (9) und (10)	
4. Schiebler et al. (80)	
5. Arnold (5) und Leder (56)	
6. Maske (63), modifiziert	
7. Gomori (zit. nach Bencosme (6), Fisher et al. (25) und Maske (63))	
II. VERSUCHSTIERE	6
1. Normal-Me	
2. Cortison-Me	
3. ACTH-Me	
ERGEBNISSE	8
I. FÄRBUNGEN	
- Färbungen 1. bis 7.	
II. VERSUCHSTIERE	10
1. Normal-Me	10
- Färbung 6.	
- Färbung 7.	
2. Cortison-Me	12
- Färbung 6.	
- Färbung 7.	
3. ACTH-Me	12
- Färbung 6.	
- Färbung 7.	
DISKUSSION	17
I. FÄRBUNGEN	17
- Färbemethoden	
- Eigene Versuche: Färbungen 1.-7.	

II. VERSUCHSTIERE	19
1. Normal-Me	20
- Quantitative Inselbeziehungen	
- B-Zellen	
- A-Zellen	
2. Cortison-Me	22
- Dosis	
- Histologische Befunde	
- Zusammenfassung	
3. ACTH-Me	24
- Reinheit des ACTH	
- Histologische Befunde	
- Korrelation von Histologie und Endo- krinologie	
A. ACTH	26
-Extraadrenale-insulinotrope Wirkung (Kurzzeit)	
-Andere endokrine Kurzzeitwirkungen	
-Corticotrope Wirkung (Langzeit)	
-ACTH-Zusammenfassung	
B. GLUCAGON	29
-These	
-A-Zellen Glucagonbildner	
-Stellung der A-Zellen	
-Glucagon als Insulinstimulans	
-Glucagon-Zusammenfassung	
C. Histologie	32
a. Corticotrope Wirkung (Langzeit)	
- Folgerungen	
b. Extraadrenal-insulinotrope Wirkung (Kurzzeit)	
- Temporär erhöhte Aktivität der A-Zellen Voraussetzung	
- Phloxin-negative Zellen	
- Folgerung	
- Selektivität von Phloxin	
- Konsequenzen der Selektivität	
c. Zeitliche Parameter	
- Versuchsdauer und Tötungszeitpunkt	
- Geschehen nach der Injektion	
- Hypothetischer Versuchsverlauf	
D. Zusammenfassung	37

S Y N O P S I S	39
- Ambivalente Glucagonwirkung	
- ACTH	
- Biochemische Wirkungsweise	
- Physiol. Stoffwechsel	
- Andere Faktoren	

Z U S A M M E N F A S S U N G	44
L I T E R A T U R L I S T E	46

E I N L E I T U N G

I. FÄRBUNG

- Nomenklatur der Inselzellen

Während in endokrinologisch orientierten Arbeiten bisher lediglich zwischen Glucagon bildenden A-Zellen und Insulin bildenden B-Zellen unterschieden wird, ist es unter den Histologen parallel mit der Entwicklung neuer Färbemethoden zu nomenklatorischen Divergenzen gekommen. So wurden von Bensley 1911 erstmals C-Zellen beschrieben, deren Plasma keinerlei Sekretionsgranula enthält (C = clear) und deren Vorkommen von Thomas 1937 und Gomori 1939 lichtmikroskopisch und von Lacy 1957 elektronenmikroskopisch gesichert werden konnte. D-Zellen beschrieb erstmals Bloom 1931, sowie Thomas 1937, Gomori 1939 und Caramia (13). Caramia et al. (14) bezifferten ihren Anteil innerhalb der Inseln mit 5 bis 6 Prozent und beschrieben sie als deutlich verschieden und von homogener Granulierung.

Vor allem schwedische Autoren unterscheiden entsprechend den Färbeeigenschaften bei Silberimprägnierung zwischen argyrophilen A_1 -Zellen und nichtargyrophilen A_2 -Zellen. Letztere werden hierbei als Glucagonbildner angesehen (Hellerström et al. (35)). Hellman (38) untersuchte die A-Zellen der Ente, wo diese eigene Inseln (dark islets) bilden, die zu 20 Prozent aus A_1 -Zellen bestehen; diese Verteilung variere jedoch: so seien beim Menschen überwiegend A_1 -, bei der Ratte A_2 -Zellen zu finden. Die A_1 -Zellen der Ente seien vorwiegend um die Kapillaren angesiedelt und verfügen über einen runderen und größeren Kern, was bedingt auf eine aktivere Funktion schließen lasse.

Signifikante Größenunterschiede bemerkten schließlich Petersson et al. (70), die die A_1 -Zellen als mit Phloxin nicht anfärbbar (phloxinnegativ), die A_2 -Zellen als phloxinpositiv beschreiben. Sie ordneten die C-Zellen

(siehe auch Moskalewski (68)) und auch indirekt die D-Zellen den A₁-Zellen zu und begründeten dies mit deren argentophilen Eigenschaften. Diese Einordnung wurde von Caramia et al. (14) zurückgewiesen, die auf die verschiedene Anfärbbarkeit mit PTAH (phosphotungstic acid hematoxylin = phosphorwolframsaures Hämatoxylin) hinweisen und diese als Kriterium benutzen. Sie konnten ihrerseits jedoch die A-Zellen in drei granulagrößenabhängige Typen A_a, A_b und A_c unterteilen, wobei die A_a-Zellen über die kleinsten Granula verfügten und quantitativ am stärksten vertreten waren.

Arnold (4) differenziert lediglich zwischen drei Zelltypen und setzt C- und D-Zellen gleich. Auch zahlreiche andere Autoren beschränken sich auf die Beschreibung von drei Zellarten: Lacy (44), sowie Bencosme et al (7), die bei den von ihnen beobachteten D-Zellen zumeist keine Granula bemerkten; (siehe auch Volk et al. (91); Wellmann et al. (92)). Eine mögliche Erklärung für diese wechselnden Interpretationen und Differenzierungen erwähnt Caramia (13): die D-Zellen seien nach Fixierung in Bouin'scher Lösung nur schlecht darstellbar. Auch Artunterschiede bei der Darstellbarkeit sind denkbar: Bencosme et al. (7) stellten bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen fest, daß die drei Zelltypen bei der Katze leichter als beim Meerschweinchen zu unterscheiden sind.

- Zielsetzung

Angesichts dieser nomenklatorischen Vielfalt war es unser Ziel, die Inseln und ihre zellulären Bestandteile so eindeutig wie möglich darzustellen: es sollte einmal eine Kernfärbung erreicht werden und weiter eine selektive Anfärbung der Inselzellen; außerdem sollte die Färbemethode routinemäßig abgewickelt werden können, d.h. sie sollte möglichst einfach sein und ohne allzugroßen Zeitaufwand und innerhalb eines möglichst geringen Zeitraums durchgeführt werden können. Unter diesen Gesichtspunkten wurden mehrere Färbemethoden untersucht.

II. VERSUCHSTIERE

- Regulierung der Insulinsekretion

Auf die Insulinsekretion wird von drei Seiten regulierend Einfluß genommen: 1. vom vegetativen Nervensystem, 2. vom physiologischen Stoffwechselgeschehen, und 3. vom Endokrinium (siehe Foà (26) und Mayhew et al (64)).

Zu 1. : Während Ferner (22) zu der Auffassung gelangte, daß die A-Zellen sympathisch, die B-Zellen parasympathisch innerviert sind, fanden Esterhuizen et al. (20) bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Katzenpankreas, daß sowohl an A- wie an B-Zellen beide Arten der Innervation, sympathische und parasympathische, anzutreffen waren. - Mayhew et al (64) bemerkten, daß dem adrenergen System möglicherweise eine hemmende Rolle bei der Insulinsekretion zukomme und daß dem cholinergen System evtl. eine Rolle bei der Regulierung der Insulinsekretion zugeschrieben werden könne.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Falck et al (21), die zu dem Ergebnis gelangen, daß die Inseln des Meerschweinchens wahrscheinlich über keine adrenerge Innervation verfügen.

Zu 2. : Als hauptsächlichsten physiologischen Stimulus der Insulinsekretion bezeichnen Mayhew et al (64) die Glukose (siehe auch Foà (26) und andere) und zählen auch andere Stimuli auf. Daneben sind auch verschiedene Aminosäuren und Ionen von Bedeutung (siehe auch Milner et al. (66)).

Zu 3. : Auch zahlreiche Hormone beeinflussen die Insulinsekretion. Auf sie und ihre jeweilige Wirkung soll hier nicht näher eingegangen werden. - Unsere Untersuchungen gelten den Auswirkungen von ACTH- und Cortison-Gaben auf die Langerhans'schen Inseln.

Bei den Wirkungen von ACTH muß zwischen den Corticotropen, d. h. die Nebennierenrinde stimulierenden, und den Extra-adrenalen unterschieden werden, welche unabhängig vom Er-

folgsorgan NNR in den Stoffwechsel eingreifen (Engel (18)). Eine dieser extraadrenalen Wirkungen ist die auf den Kohlehydratstoffwechsel, insbesondere auf die Insulinsekretion. Der genaue Wirkungsmechanismus dieses insulinotropen Effekts blieb bisher ungeklärt. Manche Untersucher erklären ihn als Anstoß eines elementaren Stoffwechselprozesses (basic metabolic process, Lebovitz et al. (54)) oder des Adenylcyclase-Systems (Malaisse et al. (60)), und auch eine Beteiligung des Glucagons und damit der A-Zellen wird diskutiert.

Unsere Untersuchungen haben zum Ziel, an Hand des histologischen Substrats zur Diskussion der ACTH- und auch der Cortison-Wirkung auf das endokrine Pankreas beizutragen.

M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

I. FÄRBUNGEN

Für die Färbeversuche wurde wenige Minuten p.m. entnommenes Schweinepankreas in Bouin'sche Flüssigkeit eingelegt und nach 24-stündiger Fixierung (20 - 21° C) folgt die Einbettung in Paraffin über Methylbenzoat. Schnitte 5 und 10 μ .

1. Färbung nach Fisher et al. (25).
2. Färbung nach Mann (Romeis (76, §723)).
3. Färbung nach Bock et al. (9) und (10).
4. Färbung nach Schiebler et al. (80).

Es wurde außerdem versucht, der Diäthylpseudoisocyanin-Färbung eine Kernfärbung mit Hämalaun P. Mayer, bzw. Kernechtrot anzuschließen, sowie eine selektive Färbung der A-Zellen mit Phloxin zu erreichen.

5. Histochemische Versuche nach Arnold (5) und Leder (56): Für diese Versuche wurden von frischentnommenem Schweinepankreas Gefrierschnitte angefertigt. Schnitte 2 und 4 μ . Nachweise von: A. "Spezifischer Esterase": Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase. B. Unspezifischen Esterasen: a. Naphtol-AS-Acetate-Esterase und Naphtol-AS-D-Acetate-Esterase; b. Alpha-Naphthyl-Acetate-Esterase. C. Kombinierten Esterasen: A. und Ba. (1).

6. Färbung nach Maske (63) modifiziert:

Nach descendierender Alkoholreihe und Aqua dest.:

1. 30 Sekunden schwefelsaures Kaliumpermanganat^a (1 Teil 2,5 % Kaliumpermanganatlösung, 1 Teil 5 % Schwefelsäure, 6 Teile Aqua dest.).
2. Kurz abspülen in Leitungswasser.
3. 10 bis 20 Sekunden in 20 % Natriumbisulfitlösung bleichen.
4. 1 Minute wässern in fließendem Wasser.
5. 5 (bis 10) Minuten in Paraldehyd-Fuchsin-Lösung (Romeis (76, §1607)) färben.

6. Waschen in fließendem Wasser und mikroskopische Kontrolle der Inseln.
7. Bei zu kräftiger Anfärbung der Inseln durch ein- oder mehrmaliges Eintauchen in 96 % Alkohol oder/und Salzsäurealkohol (0,5 % Salzsäure in 50 % Alkohol) differenzieren.
8. 1 bis 2 Minuten in fließendem Wasser spülen.
9. 4 bis 6 Minuten in Hämalan P. Mayer (Romeis (76, § 648)).
10. 20 Minuten Auswaschen in fließendem Wasser. Zwischenzeitlich mikroskopische Kontrolle, gegebenenfalls nochmals in Hämalan einbringen.
11. 4 bis 10 Minuten in 0,5 % Phloxinlösung einbringen (die wässrige Lösung frisch aus gesättigter, etwa 10 % Lösung herstellen).
12. Abspülen mit Leitungswasser.
13. 2 Minuten mit 5 % Phosphorwolframsäure behandeln.
14. 5 Minuten in fließendem Wasser spülen.
15. In 80 % Alkohol differenzieren bis die A-Zellen sich rot herausheben.

Über 96 % und absoluten Alkohol, Xylol, in Eukitt einbetten.

7. Färbung nach Gomori (zit. nach Bencosme (6), Fisher et al. (25) und Maske (63)), modifiziert. Wie in Färbung 6.: 1. bis 3. und 8. bis 15.

II. VERSUCHSTIERE

Wir nahmen Meerschweinchen (♂) gleicher Zucht mit Gewichten um 300 g. Fütterung mit "Aldometrin Me", Wasser ad lib., Haltung im stressabschirmenden Raum.

Es wurden drei Untersuchungsgruppen gebildet:

1. 4 unbehandelte Meerschweinchen (Me) zur Kontrolle,
2. 4 Me 28 Tage 5 mg/die Cortison ("Scheroson-Depot", Schering; abgekürzt Cortison),
3. 4 Me 28 Tage 4 i. E. /die ACTH "Schering" (abgekürzt ACTH).

Die Hormonpräparate wurden zwischen 9 und 10 Uhr vormittags injiziert (i.m.), 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Bauchspeicheldrüsen wenige Minuten p.m. (Chloroform) vorsichtig freipräpariert und in Bouin'sche Flüssigkeit eingelegt. Nach 24-stündiger Fixierung (20 - 21°C) folgte die Einbettung in Paraffin über Methylbenzoat. Schnitte 7,5/u.

Zur histologischen Auswertung wurden pro Versuchstier je zehn Präparate nach Maske (63) modif., gefärbt, je zehn weitere nach Gomori, modif. (s.o. unter I. Färbungen: 6. und 7. Färbung).

ER G E B N I S S E

I. FÄRBUNGEN

1. Färbung nach Fisher et al. (25):

In den von uns angefertigten Präparaten stellten sich die B-Zellen nur mit geringem Kontrast dar. Die Anfärbung der Zellkerne war nicht sehr scharf, die Dauer der Färbung erstreckt sich über zwei Tage. Weitere Versuche wurden daher eingestellt.

2. Färbung nach Mann (Romeis (76, § 723)):

Auf den Schnitten waren trotz sorgfältiger Färbung und Herstellung der Farblösung regelmäßig Niederschläge zu beobachten, die nicht wieder in Lösung gebracht werden konnten. Die Kernfärbung kam nur zart zur Geltung, A- und B-Zellen waren kaum zu differenzieren. Auch nach Verdünnen der Gegenfärbelösung Orange G von 0,5 auf 0,1 % konnten in unseren Versuchen nur ungenügende Färbungsergebnisse verzeichnet werden. Weitere Versuche wurden daher nicht angestrengt.

3. Färbung nach Bock et al. (9) und (10):

Auf Grund der langen Beiz- und Färbungszeiten, die jeweils mit dem erneuten Ansetzen der Beize und der Farblösung verbunden sind, wurden nur drei Färbeversuche durchgeführt, in denen sich keine sichere Differenzierung von A- und B-Zellen ergab.

4. Färbung nach Schiebler et al. (80):

Die Färbung mit Diäthylpseudoisocyanin führte zu einer eindeutigen metachromatischen Farbverschiebung im Zytoplasma der B-Zellen. Versuche, die Kerne mit Kernechtrot (Romeis (76, § 737) oder Mayer'schem Hämalaun gegenzufärben, führten allerdings ebenso wie die Versuche, eine selektive Anfärbung der A-Zellen mit Phloxin zu erreichen, zu einem sofortigen Verblassen der Metachromasie und Fluoreszenz der Schnitte und damit der Differenzierbarkeit der Inselzellen.

5. Histochemische Versuche nach Arnold (5) und Leder (56):

Die Inseln waren nicht in allen Präparaten identifizierbar. Innerhalb der Inseln waren mikroskopisch keine typischen esterasepositiven histochemischen Reaktionen zu erkennen.

6. Färbung nach Maske (63) modifiziert:

Nach der Behebung einiger technischer Schwierigkeiten stellte sich diese Dreifachfärbung als zufriedenstellend zuverlässig heraus. So mußten wir die Erfahrung machen, daß das schwefelsaure Kaliumpermanganat täglich neu anzusetzen ist, daß das Einbringen der Präparate in 96 % Alkohol nach der Färbung mit Aldehyd-Fuchsin erst nach Waschen und mikroskopischer Kontrolle und nur im Bedarfsfall sinnvoll ist und die Färbung der B-Granula gewährleistet, und daß die Kernfärbung mit Hämalaun P. Mayer zwar etwas zarter, doch besser dosierbar war als die mit Eisentrioxihämatein nach Hansen (Romeis (76, § 672)).

Die Langerhans'schen Inseln heben sich bei dieser Färbung deutlich vom umgebenden exokrinen Pankreas ab. Die B-Zellen sind an ihrer intensiv blauen Granulierung des Zytoplasmas eindeutig zu erkennen, die A-Zellen sind durch ihr homogen blaß- bis mittelrotes Zytoplasma ausgezeichnet. Die Umrisse der Zellkerne gelangen zusammen mit einem oder mehreren Nukleolen in schwärzlichem bis dunkelrotem Farbton zur Darstellung. Die azinären Strukturen des exokrinen Pankreas werden durch die mittelblau-rote Anfärbung der Zellperipherie und die lumenwärts erst rot dann blaßrot erscheinenden Zymogengranula noch unterstrichen.

7. Färbung nach Gomori (zit. nach Bencosme (6), Fisher et al. (25) und Maske (63)) modifiziert:

Die hier blaßrosa angefärbten Inseln enthalten deutlich

erkennbare A-Zellen, deren Zelleib mittelrot, feingranuliert und scharf begrenzt imponiert. Die B-Zellen erscheinen gleichmäßig blaßrosa und weniger intensiv angefärbt, ähnlich wie dies bei mit HE oder nach van Gieson angefärbten Präparaten der Fall ist.

II. VERSUCHSTIERE

1. Normal-Me

- Färbung 6.: nach Maske (63) modifiziert:

Die Langerhans'schen Inseln erscheinen aufgelockert strukturiert; konfluierende, gewundene Zellstränge ("cords", LeCompte (55)) von wechselndem Durchmesser und fast ausschließlich aus B-Zellen bestehend prägen das Bild ebenso wie kleinere, am Inselrand lokalisierte Verbände von A- und auch B-Zellgruppen, jeweils voneinander getrennt durch zellfreie Aussparungen und trabekuläre Gewebelemente. "Die Form der kleinen Inseln ist meist rundlich, die der größeren eher oval, bisweilen auch etwas unregelmäßig" (Arnold (4)). Gegenüber dem exokrinen Pankreas grenzen sich die größeren Inseln mit einer Kapsel ab, welche jedoch an einzelnen Stellen unterbrochen ist. Dort ebenso wie bei sehr kleinen Inseln scheinen endokrines und exokrines Gewebe strukturell nahtlos ineinander überzugehen. Dabei bleiben die Übergänge färberisch gut abgrenzbar.

Die B-Zellen nehmen etwa 75 Prozent der Fläche der mittelgroßen und großen Inseln ein, bei kleineren Inseln sind fast ausschließlich B-Zellen zu finden. Ihre Kerne sind gleichmäßig groß und von runder Form (Lacy (44)). "Im Kerninneren befinden sich ein bis vier distinkte Nukleoli (bzw. zwei bis drei, Arnold (4)), oft in engem Kontakt mit der Nuklearmembran" (Andersson (2)). Die Zellen stehen dichtgepackt in konfluierenden Formationen. Die Zellgrenzen innerhalb der Zellstränge können kaum ausgemacht werden. Das Zytoplasma erscheint mit blauen Granula

ausgefüllt. In randständigen Partien tritt eine etwas verstärkte Granulierung auf, während man perinukleär zumeist eine Aufhellung erkennen kann, die nach Anderson (2) die Golgi-Zone wiedergeben soll. Mitosen sind nach Arnold (4) kaum, nach LeCompte (55) extrem selten zu beobachten.

Die A-Zellen sind vorzugsweise in der Inselperipherie zu finden und werden von Ferner (22) daher auch als Mantelzellen bezeichnet. Sie stehen dort meist in kleinen, runden bis länglichen Zellgruppen. Einzelne Zellen, manchmal auch kleine Gruppen, befinden sich am Rand von B-Zellformationen (siehe auch Lazarus (52)). Die Kerne sind beim Me größer als die der B-Zellen, häufig sind elip-tische (ovoid, Lacy (44)) Kernformen zu erkennen. Der Zelleib ist entsprechend der geringeren Kerndichte voluminöser als der der B-Zellen. Das Zytoplasma ist homogen mit einem mittleren Rot angefärbt, bei starker Vergrößerung wird eine gleichmäßig verteilte, feine Granulierung sichtbar. Mitosen wurden von Arnold (4) nicht beobachtet.

Nichtangefärbte Zellen wurden nur wenige beobachtet, eine genaue Unterscheidung und Zuordnung war nicht möglich.

Die nichtangefärbten Gewebslücken zwischen den Strängen von Inselzellen sind vermutlich nicht auf Schrumpfungen zurückzuführen, ihr Inhalt wurde wahrscheinlich bei der Färbung herausgewaschen.

Vielfach sind Inselstränge auch durch trabekelähnliche canaliculäre Gewebszüge abgegrenzt, die den von mehreren Autoren (Lazarus et al. (48)) beschriebenen epithelialen Duktuli entsprechen dürften. - Bei den Langerhans'schen Inseln des Me fällt auf, daß sie, im Gegensatz zum Pankreas von Ratte, Rind und Schwein, nur wenig vaskularisiert sind.

- Färbung 7.: nach Gomori, modifiziert:

Bei den mit Hämalaun-Phloxin gefärbten Präparaten sind die Inseln kaum angefärbt. Die nichtangefärbten B-Zellen lassen sich von den selektiv angefärbten, roten A-Zellen sehr gut unterscheiden; auch gegenüber dem exokrinen Pankreas, dessen Rot neben der azinären Zellanordnung matter und mit einem Grauton versehen erscheint. Die Konturen der A-Zellen kommen bei dieser Färbung besser zur Geltung als bei der Dreifachfärbung. Die B-Zellformationen erscheinen dagegen nivelliert blaßrosa.

2. Cortison-Me

- Färbung 6.: nach Maske (63), modifiziert:

Die Inseln der mit Cortison vorbehandelten Versuchstiere weisen gegenüber denen der Kontrolltiere keine größeren Veränderungen in Größe und Struktur auf. Ein Auftreten von Inselneubildungen ist nicht festzustellen. Die B-Zellen sind etwas intensiver granuliert. Bei den A-Zellen erscheint der Zellkern im Durchschnitt etwas größer, das Auftreten von elliptischen Kernumrissen vermehrt. Eine Erhöhung der Mitoseaktivität wurde nicht beobachtet. Keine Unterschiede waren auch in der Erscheinungsform der Nukleoli festzustellen, die nach Sandritter, Ferderlin und Pfeffer (zit. nach Andersson (2)) an der Proteinsynthese der Inselzellen beteiligt sind und die funktionelle Aktivität reflektieren.

- Färbung 7.: nach Gomori, modifiziert:

Hier kamen gegenüber den Normal-Me keine signifikanten Veränderungen zur Darstellung, mit Ausnahme der oben erwähnten geringgradigen Vergrößerung der A-Zellkerne.

3. ACTH-Me

- Färbung 6.: nach Maske (63) modifiziert:

Die Langerhans'schen Inseln heben sich schon bei Lupenvergrößerung farblich vom exokrinen Pankreas ab und er-

scheinen prall gefüllt mit B-Zellen. Gegenüber den Inseln der Kontrolltiere sind sie deutlich vergrößert und unregelmäßiger konturiert. Vor allem sind zahlreiche kleinere Inseln festzustellen, die als Neubildungen anzusehen sind (Hausberger et al. (54)) und den Inselanteil des Pankreas erheblich erhöhen. Die neugebildeten Inseln sind gegenüber dem exokrinen Pankreas nur wenig bindegewebig abgegrenzt.

Die B-Zellen besitzen mit 90 bis 95 Prozent einen stark erhöhten Inselanteil. Bei kleinen Inseln sind fast ausschließlich Aldehyd-Fuchsin angefärbte Zellen zu erkennen. Die Kerne der B-Zellen sind gegenüber denen der Normalme deutlich vergrößert. Sie stehen auch weniger dicht gedrängt, was als Erhöhung des Zellvolumens gedeutet werden darf. Ihr Zytoplasma ist gleichmäßig und sehr dicht mit intensiv blauen Granula bepackt.

Weder von Aldehyd-Fuchsin noch von Phloxin angefärbte Zellen sind in kleinen Gruppen in der Inselperipherie und vereinzelt im Inselinneren zu finden. Ihre Kerne erscheinen einheitlich rund und im Durchschnitt kleiner als die der A-Zellen, deren Lokalisation sie aufweisen. Das Zytoplasma ist kaum angefärbt, scheint aber über eine grobe, unregelmäßige Granulierung zu verfügen.

Die Nukleoli der Inselzellen wiesen keine Veränderungen auf.

- Färbung 7.: nach Gomori, modifiziert:

Bei den mit Hämalaun-Phloxin gefärbten Präparaten waren lediglich bei einer einzigen Insel eines einzigen Versuchstiers Phloxin-positive A-Zellen festzustellen. In allen anderen Inseln konnten A- und B-Zellen nicht, bzw. nicht sicher differenziert werden.

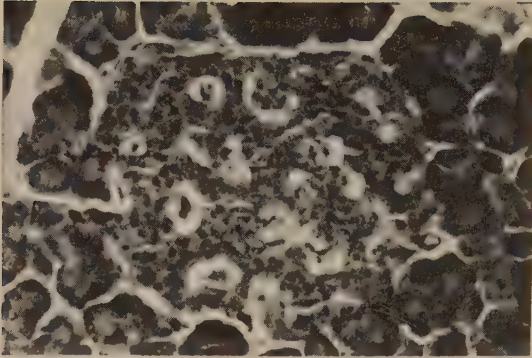


Abb. 1: Normal-Me

Färbung 6.: nach Maske (63), modifiziert. Abbildungs-
maßstab 340:1. (Text s. S. 10 ff.)

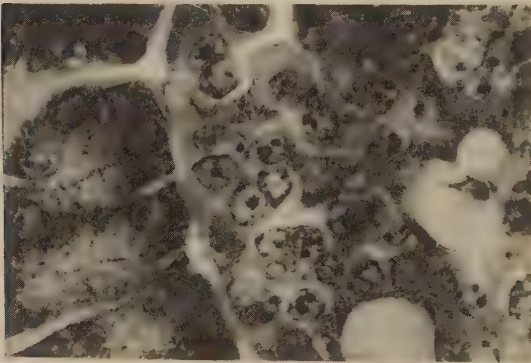


Abb. 2: Normal-Me

Färbung 6.: nach Maske (63), modifiziert. Abbildungs-
maßstab 1360:1. Exokrines Pankreasgewebe im linken
Bilddrittel. (Text s. S. 10 ff.)

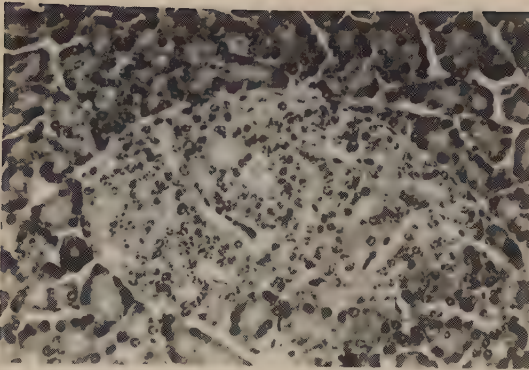


Abb. 3.: Cortison-Me

Färbung 7.: nach Gomori, modifiziert. Abbildungsmaßstab 340:1. (Text s. S. 12.)

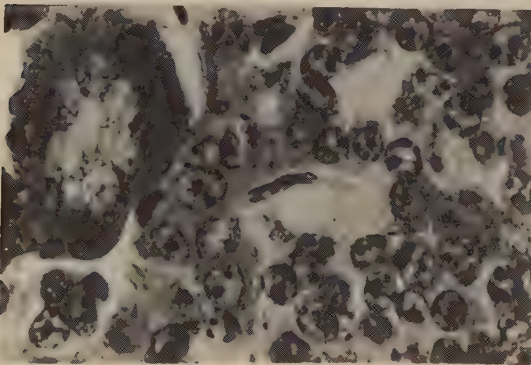


Abb. 4: Cortison-Me

Färbung 7.: nach Gomori, modifiziert. Abbildungsmaßstab 1360:1. Exokrines Pankreasgewebe im linken Bild-drittel. (Text s. S. 12.)

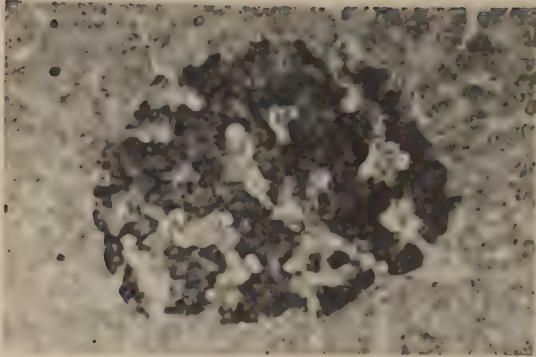


Abb. 5: ACTH-Me

Färbung 6.: nach Maske (63), modifiziert. Abbildungs-
maßstab 340:1. (Text s. S. 12 ff.)

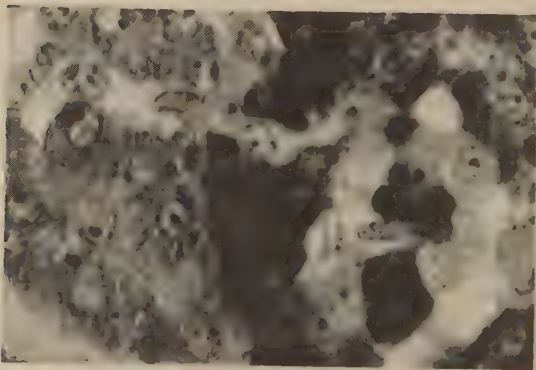


Abb. 6: ACTH-Me

Färbung 6.: nach Maske (63), modifiziert. Abbildungs-
maßstab 1360:1. Exokrines Pankreasgewebe im linken Bild-
drittel. (Text s. S. 12 ff.)

DISKUSSION

I. FÄRBUNGEN

- Färbemethoden

"Beim Durchmustern histologischer Pankreas-Präparate fallen uns die Langerhans'schen Inseln als helle, wenig gefärbte Zellgruppen auf. Ohne besondere Fixations- und Färbemethoden scheinen die Inseln aus gleichartigen Zellen aufgebaut zu sein. Erst Schulze (1900) vermochte zwei verschiedene Zellsorten zu unterscheiden. Lane (1907) und Bensley (1911) gelang es, färberisch einwandfrei A- und B-Zellen zu unterscheiden. Ihre Methode bewährte sich freilich zahlreichen Untersuchern nicht" (Arnold (4)).

Allgemeine Verbreitung fand erstmals die von Gomori 1939 beschriebene Färbung mit Chromhämatoxylin-Phloxin. Parallel mit ihr wurde häufig auch mit der Masson'schen Trichromfärbung (Romeis (76, § 1538)) und z.B. mit Schiff'schem Reagens (Romeis (76, § 1195)) gefärbt (Lazarus et al. (48, 50, 51), Bencosme (6), Volk et al. (90)) oder aber mit Silberimprägnierung nach verschiedenen Methoden (Ferner (22), Hellman (38), Petersson et al. (70)), die teilweise nach Oxydierung eine erneute Färbung zulassen.

Neue selektive Färbemethoden wurden u.a. von Ivić (39) und Bock et al. (9) und (10) beschrieben, erreichten jedoch nicht die "allgemeine Anerkennung" (Lazarow (47)) der von Gomori (30) beschriebenen Aldehyd-Fuchsin-Färbung. Sie stellte sich nach Lazarow (47) als eine der zuverlässigsten und meistbenutzten heraus, insbesondere als schon bald (Hartroft et al. (32)) aufgezeigt wurde, daß zwischen der Aldehyd-Fuchsin-positiven Granulierung der B-Zellen und dem aus dem Pankreas extrahierbaren Insulin ein direkter Zusammenhang besteht.

- Eigene Versuche

Färbung 1.: Fisher et al (25) kombinierten erstmals Phloxin nach Gomori und Aldehyd-Fuchsin nach Gomori (30),

um A- und B-Zellen gleichzeitig selektiv anzufärben. Unsere Versuche führten nur zu beschränkten Erfolgen, ließen die von uns angestrebte kräftige Anfärbung der Kerne und einen zügig abzuwickelnden Färbevorgang nicht zu und wurden daher eingestellt.

Färbung 2.: Von Aldehyd-Fuchsin und Phloxin vorübergehend abgekommen, wurden Versuche mit der von Arnold (4) verwendeten Mann'schen Lösung unternommen; doch bildeten sich hier Niederschläge, deren Ursache nicht ergründet werden konnte. Kern- und Gegenfärbung waren in unseren Versuchen nicht befriedigend ausgeprägt und für eine genaue Differenzierung nicht ausreichend. Weitere Färbungen wurden daher nicht durchgeführt.

Färbung 3.: Die von Bock et al. (9) und (10) beschriebene Färbung mit Chromalaun-Gallocyanin wurde ebenfalls bald eingestellt, da der damit verbundene Zeitaufwand für die routinemäßige Anwendung zu hoch erschien.

Färbung 4.: Die von Schiebler et al. (80) beschriebene Färbung ergab zwar gute Erfolge, doch gelang es uns nicht, die Metachromasie während weiterer, zusätzlicher Färbeschritte zu erhalten und damit unsere Zielvorstellungen zu erfüllen.

Färbung 5.: Die histochemischen Versuche mit Nachweisen von "spezifischen" und unspezifischen, sowie kombinierten Esterasen waren spekulativer Art. Mikroskopisch konnte in den Inseln keine Esteraseaktivität nachgewiesen werden. Es blieb allerdings unklar, ob die Färbung mit Alpha-Naphtyl-Acetat-Esterase technisch einwandfrei durchgeführt wurde.

Färbung 6.: Die Anfärbung von A- und B-Zellen bei gleichzeitiger Kerndarstellung versprach schließlich die Methode nach Maske (63), die auch Mohnike et al. (67) bei ihren Untersuchungen am Pankreas verwendet hatten. Maske (63) ergänzte die Färbung von Fisher et al. (25) durch die Einführung der Kernfärbung mit Eisentrioxyhämatein nach

Hansen. "Außerdem wurde die Darstellung der B-Zellen mit Aldehyd-Fuchsin durch eine Vorbehandlung mit Gomoris KMnO_4 -Lösung wesentlich abgekürzt und durch die Verwendung einer haltbaren Aldehyd-Fuchsin-Lösung nach Gabe und Harms vereinfacht" (Maske (63)). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß A- und B-Zellen selektiv gefärbt werden und sich nicht nur durch eine allgemeine Gegenfärbung sozusagen passiv voneinander abheben.

Färbung 7.: Die Hämalaun-Phloxin-Färbung entspricht im Wesentlichen der von Gomori beschriebenen Chromhämatoxylin-Phloxin-Methode, wo die A-Zellen selektiv zur Darstellung gelangen. Der Färbevorgang nach Maske (63) wurde von uns verkürzt und erheblich vereinfacht. Allerdings kann damit u.U. eine Differenzierung nicht oder nur unvollkommen gelingen, da sich die B-Zellen hier nur im Rahmen der Grundfärbung, d.h. passiv, darstellen.

II. VERSUCHSTIERE

Nachdem die Färbung nach Maske (63) modifiziert, unserer Zielsetzung am nächsten gekommen war, wurden die Pankreas-schnitte der Versuchstiere nach dieser Methode behandelt. Eine gleiche Zahl von Schnitten wurde mit Hämalaun-Phloxin gefärbt.

Da unsere Präparate in Bouin'scher Lösung fixiert wurden und hier D-Zellen nicht zur Darstellung gelangen (Caramia (13)), können wir die D-Zellen aus unserer Diskussion ausklammern und uns auf die Einteilung in drei Zelltypen beschränken. Da weiter A_1 - und A_2 -Zellen nur mittels Silberimprägnierung, nicht aber mit anderen herkömmlichen Methoden, darunter auch Chromalaun-Phloxin, differenziert werden können (Petersson et al. (70)), werden wir für unsere Versuche der Aufteilung in A-, B- und C-Zellen den Vorzug geben. Der Frage der Identifizierung und Zuordnung der C-Zellen, die nur einen geringen Inselanteil einnehmen, soll jedoch erst in einem späteren Abschnitt nachgegangen werden.

1. Normal-Me

- Quantitative Inselbeziehungen

Die Größe der Zellkerne von A- und B-Zellen variiert bei den verschiedenen Tierarten: so wurde von Arnold (4) das Volumen der A-Zellen mit $62/\mu^3$, das der B-Zellen mit $88/\mu^3$ bei der Albinoratte, von Hellman et al. (37), bei der Maus die B-Zellen größer als die A-Zellen beschrieben. Petersson et al. (70) wiederum fanden beim Me die A_2 -Zellen größer als die A_1 -Zellen und diese wiederum größer als die B-Zellen.

Ähnlich sind die Artunterschiede in der Literatur für das quantitative Verhältnis von A- zu B-Zellen: Heß (zit. nach Arnold (4)), beschreibt 90 % B-Zellen beim Menschen, 80 % bei der Ratte, ebensoviel wie Täljedal et al. (86) bei der Maus feststellten. Lacy (45) beziffert den Anteil der B-Zellen generell mit 60 bis 70 %. Petersson et al. (70) fanden 60 % B-, 30 % A_2 - und 10 % A_1 -Zellen.

Geringere Schwankungen werden für das Verhältnis Pankreas/Insel genannt: Kinash et al. (41) fanden bei der Ratte 3,8 g Inselanteil bei 100 g Pankreasgewicht, Yoshinaga et al. (93) geben 0,75 %, Lacy (45) 1 bis 2 % an. - Lazarow (47) bemerkte im caudalen Pankreas mehr Inseln als im Pankreaskopf, Heiberg (zit. nach Arnold (4)), setzt hierfür das Verhältnis 1:5; Hausberger et al. (34) fanden, daß entlang der dorsalen Zentralarterie die Inseln größer, in den peripheren Anteilen kleiner und weniger seien. Heiberg (zit. nach Arnold (4)) notierte das Verhältnis Insel- zu Drüsengewebe mit 1:5 bei der 24 Stunden alten Maus, 1:27 bei der halbausgewachsenen und 1:119 bei der ausgewachsenen.

- B-Zellen

Die Granula der B-Zellen des Me wurden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Bencosme et al. (7) als sphärisch und nicht sehr dicht liegend beschrieben, von Lacy (45) ihr Durchmesser mit $230 m/\mu$ angegeben. Für

die Granulierung der B-Zellen stellten Han und Haist (zit. nach Field (24)), erstmals einen Zusammenhang mit dem extrahierbaren Insulin fest, Randle et al. (73) mit der Insulin-ähnlichen Aktivität (insulinlike activity). Hartroft et al. (32) interpretierten die Aldehyd-Fuchsin-positive Granulierung als Insulin oder Insulinvorgänger (precursor); Maske (62) (siehe auch Mohnike et al. (67)) schloß aus der positiven Dithizonreaktion mit Zink auf die Anwesenheit einer besonderen Stapelform von Insulin und bemerkte (zit. nach Field (24)), daß vor dem Verlust an Granula eine Verminderung des angefärbten Zinks eintrete. Diese zeitliche Diskordanz wurde auch von Mohnike et al. (67) gefunden, die die Extinktionen beider Färbungen photometrisch u.a. nach Dextrosegaben miteinander verglichen. Lazarus et al. (zit. nach Field, (24)) zeigten schließlich, daß Aldehyd-Fuchsin weniger Insulin selbst als vielmehr den membranösen Sack des Granulums anfärbt. Randle et al. (74) halten zwar für möglich, daß Insulin auch teilweise im Zytoplasma zu finden sei, doch konnte Lacy (45) den Sekretionsvorgang erstmals elektronenmikroskopisch festhalten und klären. Es wird daher heute allgemein akzeptiert, daß Änderungen in der Anfärbbarkeit mit Aldehyd-Fuchsin den Granulationsstatus und auch den Insulingehalt genau wiedergeben (Bencosme (8)).

Der Sekretionsvorgang verläuft in Form einer Emiozytose und wird von Lacy (45) bei jedem Sekretionsstimulus als gleich beschrieben. Legg (57) und auch Lever (58) meinen andererseits die Insulinfreisetzung (auch) auf dem Wege einer intraplasmatischen Auflösung (dissolution) erkennen zu können.

Hellman et al. (36) konnten keine Größenunterschiede der B-Zellen bei peripherer und zentraler Lage innerhalb der Inseln bemerken. Scharff et al. (79) bezeichneten beide Lokalisationen karyometrisch a priori für unvergleichbar. Bei subjektiver Mikroskopie konnten wir keine Unterschiede der Kerngrößen in Abhängigkeit von der Lage bemerken.

- A-Zellen

Das Kernchromatin der A-Zellen ist nach Lazarus et al. (52) gleichmäßiger verteilt als das der B-Zellen. Ihr Zytoplasma weist scharfe Grenzen sowie eine homogene Verteilung bei stets hoher Dichte der Granula auf. Lacy (44) nennt einen Granuladurchmesser von 180 m/μ.

Den Sekretionsvorgang beschreiben Lazarus et al. (52) als subendotheliale Dissolution, nachdem die Granula in toto die Zellmembran passiert haben. Siegenthaler (83) bezeichnet den Sekretionsmechanismus bei A- und B-Zellen als gleich und in Form einer Emiozytose.

2. Cortison-Me

Die Literatur über die Auswirkungen von Cortison auf das endokrine Pankreas ist umfangreich und nur schwer zu überblicken, da die Dauer der Applikation, deren Höhe und auch weitere exogene Einflußnahmen medikamentöser und operativer Art ebenso unterschiedlich sind wie die daraus resultierenden Ergebnisse.

- Dosis

Eine Dosis von 1 mg/kg/die wird im Tierversuch noch als subdiabetogen angesehen, wenngleich sie bereits eine geringgradige Hyperglykämie hervorruft (Wellmann et al. (92)), die von Hausberger et al. (33) allerdings nicht festgestellt wurde. Meistens liegen die verabreichten Dosen jedoch deutlich über dieser Schwelle.

- Histologische Befunde

Ein Grund dafür, daß bei in-vitro-Versuchen durch Cortison keine Insulinsekretion hervorgerufen wird (Mayhew et al. (64) und Vance et al. (88)), ist darin zu sehen, daß der Wirkungseintritt erst mit 24-stündiger Verspätung erfolgt (Engel (18), zit. Albertson) und evtl. auf einer erst langsam einsetzenden Glukoneogenese beruht.

Bei der noch recht geringen Dosis von 4,5 mg/kg fanden Hausberger et al. (33) nach zwei Tagen die Inseln vergrößert bei normaler Granulierung; nach fünf Tagen stellten sich bereits eine Kapillarvergrößerung, partielle Degranulierung und eine ausgeprägte Hypertrophie und Hyperplasie der B-Zellen ein. Ähnliches beschreiben Lazarus et al. (51), die A-Zellen erschienen hierbei normal. Am 40. Tag waren Inselvolumen und Neubildungen von B-Zellen beträchtlich erhöht, bei möglicherweise verminderter Granulierung und nicht vergrößerten Kapillaren. Der Blutzucker blieb während der gesamten Versuchsdauer im Normbereich. Volk et al. (91) bemerkten bei ähnlicher Dosierung, daß die Granula vermehrt in Zellmembrannähe stehen und die Mitoseaktivität erhöht ist. Lazarus et al. (51) bezeichnen die Trias Degranulierung, Hypertrophie und Neogenese der B-Zellen als Adaption des Pankreas.

Bei höheren Dosen kommt es neben der Inselhypertrophie auch zu Inselneubildungen (Hausberger et al. (33) und Kitabachi et al. (42)), die fast ausschließlich aus B-Zellen bestehen. Die zumindest prozentual zum hypertrophen Inselgewebe vermindert vertretenen A-Zellen verfügen über kleinere (Mancini et al. (61)) bzw. nicht eindeutig veränderte Kerne (Kracht (42)), deren Chromatingehalt angereichert ist (Lazarus et al. (49)). Der normale Inselanteil am Pankreas von ca. 1 % steigt bis auf ein Drittel (Hausberger et al. (33)), wobei nicht nur eine Erhöhung des Verhältnisses Insel-/Körpergewicht verzeichnet wurde, sondern auch das Pankreas selbst an Gewicht zunimmt (Kinash et al. (41)). Des weiteren finden sich unregelmäßige Inselkonturen und eine vermehrte bindegewebige Lobulierung (Lazarus et al. (48)).

Hausberger et al. (33) bemerken in diesem Dosisbereich bereits eine fast vollständige Degranulierung und eine zumindest relative Verminderung der A-Zellen sowie hydroplische Degenerationerscheinungen. Lazarus et al. (49) berichten, daß die A-Zellen auf Grund ihrer Degranulierung mit der Gomori'schen Chromalaun-Phloxin-Färbung

nur unsicher zur Darstellung gebracht werden konnten und daß zur Identifizierung andere Färbungen eingesetzt werden mußten.

Während die bisher geschilderten Erscheinungen nach Absetzen des Corticoids noch reversibel sind (Hausberger et al. (33)), sind hydropisch geschädigte B-Zellen nicht mehr in der Lage sich zu erholen, so daß über einen längeren Zeitraum aufrecht erhaltene höhere Cortisongaben oder auch primär sehr hohe Dosen zu nicht mehr anfärbbarem, reticulärem und teilweise vakuolisiertem Zytoplasma, sowie graduell zunehmender Kernpyknose und abschließendem Zelltod führen. Es verbleiben A-Zellen, ungranulierte und undifferenzierbare Zellen (Lazarus et al. (51)). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Wellman et al. (92) und Volk et al. (91) nach Alloxanschäden, sowie Bubnova (11), der langfristige Cortisongaben beim Menschen auswertete.

- Zusammenfassung

Da bei unseren Präparaten nur geringe morphologische Veränderungen zu erkennen waren, befand sich die von uns applizierte Cortisondosis von 15 mg/kg/die offenbar nur wenig über dem unter-schwelligen Bereich. Eventuell kann eine karyometrische Auswertung der Inseln zu exakteren Ergebnissen gelangen. Eine Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit der Literatur kann in Hinblick auf die applizierte Dosis bejaht werden.

3. ACTH-Me

Histologische Arbeiten über die Auswirkungen von ACTH-Gaben auf die Langerhans'schen Inseln des Pankreas sind demgegenüber vergleichsweise selten und gelangen teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen. Mögliche Gründe könnten etwa in der jahreszeitlich variablen Ansprechbarkeit auf ACTH liegen, die Lebovitz et al. (53) bei der Lipolyse feststellte und mit einem Maximum im September und einem Minimum im Februar beschrieb. Auch Schwankungen der ACTH-Sekretion im Tagesverlauf könnten dafür mitverantwortlich sein (siehe auch Siegenthaler (83)).

- Reinheit des ACTH

Anselmino et al. (3) beschrieben nach Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakten eine Vergrößerung des Inselanteils um das zwei- bis vierfache, eine vermehrte Granulierung der B-Zellen und eine Verdoppelung des extrahierbaren Insulins (zit. Marks und Young, 1940), führten diese Erscheinungen jedoch auf die Verunreinigung durch ein weiteres Hormon zurück und schrieben dem ACTH selbst keine insulinotrope Wirkung zu. - Die Reinheit des ACTH, von Engel et al. (17) noch als nicht voll gesichert beschrieben, konnte von Lebovitz und Engel (53) chromatographisch nachgewiesen werden. Gries et al. (31) fanden bei Untersuchungen über lipolytische Auswirkungen von ACTH keine Unterschiede zwischen nativem Schweine-ACTH und synthetischem beta-Corticotropin. Siegenthaler (83) vermerkt für ACTH eine Speziespezifität bezüglich Struktur und Antigenität, nicht aber bezüglich der biochemischen Wirkung. - Wir wollen daher von der Voraussetzung ausgehen, daß es sich bei den histologischen Veränderungen um ACTH-Wirkungen handelt und sie als solche interpretieren.

- Histologische Befunde in der Literatur

Kinash et al. (41) und Hausberger et al. (34) fanden nach ACTH-Gaben Hypertrophie und Hyperplasie der Inseln, sowie eine Zunahme der B-Zellen an Zahl und Größe bei gleichzeitiger Degranulierung. Die Degranulierung kann hier wohl nach Field (24) als vermehrte Synthese bei verminderter Lagerung angesehen werden. Foà et al. (26) schrieben, daß zumeist Hypertrophie der Inseln mit vermehrtem Insulingehalt (zit. Wrenshall, 1952) manchmal auch Degranulierung und Degeneration mit Verschwinden der B-Zellen verzeichnet wurden. Letztere Erscheinungen müssen als Dekompensationszeichen angesehen werden.

Die A-Zellen erschienen Hausberger et al. (34) bei Versuchen mit ACTH-sezernierenden Tumoren vermindert und unter den degranulierten B-Zellen kaum erkennbar - ähnliches

bemerkten Hellman et al. (37) bei adipös-hyperglykämischen Mäusen. Da hier mit Chromhämatoxylin-Phloxin nach Gomori gefärbt wurde, kann dies gut mit unseren Ergebnissen der Hämalaun-Phloxin-Färbung verglichen werden, wo für die A-Zellen die gleiche Beobachtung gemacht werden konnten.

Wir können in diesem Punkte also eine gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse für A- und B-Zellen konstatieren, wobei die von uns applizierte ACTH-Dosis zwar zu signifikanten Veränderungen führte, die Schwelle zur Dekompensation jedoch nicht erreichte.

- Korrelation von Histologie und Endokrinologie

Da zwischen dem Gehalt des Pankreas an Insulin und der Granulierung der B-Zellen ein direkter Zusammenhang besteht, insbesondere für die Anfärbbbarkeit mit Aldehyd-Fuchsin, ergibt sich für uns die Möglichkeit, unsere histologischen Befunde direkt mit endokrinologischen Untersuchungsergebnissen anderer Autoren zu vergleichen, ergänzen und zu erweitern.

A. ACTH

"Die physiologische Wirkung des ACTH besteht in einer Stimulierung der Nebennierenrinde. Die Produktion von Rindenhormon (hauptsächlich Cortisol) wird gesteigert, welches die Glukoneogenese aus Protein aktiviert" (Karlsson (40)).

- Extraadrenale-insulinotrope Wirkung (Kurzzeit)

Neben der corticotropen bestehen extraadrenale Wirkungen von ACTH, die von Astwood et al. 1953 (zit. nach Engel (17)) erstmals beschrieben wurden. In Hinblick auf unsere Untersuchungen ist besonders die insulinotrope Wirkung von Bedeutung, welche für eine schnell einsetzende, intensive und hypoglykämisierende Insulinausschüttung verantwortlich ist (Genuth et al. (28)). Engel et al. (18) konnten nach eigenen Untersuchungen an normalen und

adrenalektomierten Ratten die von Westermayer und Raben 1954 erstmals beobachtete hypoglykämische Reaktion nach ACTH-Gaben bestätigen und führten sie auf eine Stimulierung der Insulinsekretion zurück. DeBodo et al. (16) nahmen eine durch ACTH gesteigerte Leberglykogenolyse als Stimulans an. Oshawa et al. (zit. nach Mayhew (64)) stellten nach ACTH-Gaben bei Hunden schließlich eine erhöhte Insulinfreisetzung fest, Sussman et al. (84) auch bei Perfusion des isolierten Pankreas. Anderson et al. (1) hatten dagegen im abgeleiteten Pankreasvenenblut keinen erhöhten Insulingehalt nachweisen können.

Bei in-vitro-Versuchen mit incubiertem Kaninchenpankreas konnten Coore et al. (15) keine Auswirkungen von ACTH auf die Insulinsekretion feststellen, Telib (87) verzeichnete nur geringe Effekte. Malaisse et al. (60) dagegen bemerkten, daß, im Gegensatz zu in-vivo-Versuchen, bei den in-vitro-Versuchen mit isolierten Pankreasstücken eine ACTH-bedingte Insulinfreisetzung erst bei recht hohen Glukosekonzentrationen (300 mg%) zur Entfaltung gelange. Sie schlossen daraus, daß ACTH nicht auf direktem Wege an der Insulinsekretion beteiligt sei und nehmen eine Beteiligung des Adenylcyclase-Systems an. Mayhew et al. (64) schreiben dem ACTH (und auch dem TSH) einen "direkten" Effekt auf die Insulinsekretion insofern zu, als beide Hormone, im Gegensatz zu den Corticoiden, STH und Thyroxin, auch bei in-vitro-Versuchen wirksam seien und nicht nur substituierend Organdefekte wieder beheben können.

Daß ACTH-Gaben auf extraadrenalem Wege "direkt" insulino-trop wirksam werden, die Insulinsekretion stimulieren und hiermit reaktiv eine Hypoglykämie herbeiführen, kann also als hinreichend gesichert betrachtet werden. Der genaue Wirkungsmodus und eine Abhängigkeit von der Blutzuckerausgangskonzentration verbleiben jedoch noch ungeklärt.

Charakteristisch für die insulinotrope Wirkung ist ein kurzfristiger Wirkungseintritt wie auch die baldige Normalisierung des Blutzuckerspiegels beim intakten Versuchstier. Da sich der Hypoglykämie eine Hyperglykämie anschließt, sollen entsprechend die Bezeichnungen Kurzzeit- und Langzeitwirkung verwendet werden.

- Andere endokrine Kurzzeitwirkungen

Neben der extraadrenalen Wirkung des ACTH wird gleichzeitig, wenn auch vielleicht nur in geringerem Umfang, Adrenalin und/oder Glucagon wirksam; auch muß an eine Einflußnahme von Seiten des corticotropen Effekts, d.h. der Nebennierenrinde gedacht werden. So beobachteten Genuth et al. (28) nach ACTH-Applikation erwartungsgemäß eine Hypoglykämie, bei weitgehender Blockierung der Insulinfreisetzung durch Mannoheptulose jedoch eine deutliche Hyperglykämie; das gleiche Ergebnis konnte auch bei in-vitro-Versuchen erzielt werden, wenngleich hier der Anstieg des Insulinspiegels nur geringer ausgeprägt war. Ney et al. (69) fanden, in Abhängigkeit von der "adrenalosteroidogenic responsiveness", ein Ansteigen des Steroidspiegels bereits Minuten nach ACTH-Gaben.

- Corticotrope Wirkung (Langzeit)

Die kurzfristig wirksam werdenden Wirkungen der ACTH-Gaben müssen langfristig gesehen durch die Corticotrop-Diabetogenen ergänzt werden. Hier dürfte es sich wohl vor allem um Auswirkungen der Aktivierung der Nebennierenrinde, d.h. um Cortison-Wirkungen handeln, die zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels und reaktiv zu einer gesteigerten Insulinausschüttung führen. So schreibt Field (24): "Da die Hyperglykämie hier also in beiden Fällen (Cortison und ACTH) gemeinsamer Stimulus ist, überrascht es nicht, daß auch die histologischen Veränderungen ähnlich sind." Auch Lazarow (47) findet bei 80 bis 95 % Pankreasresektion, d.h. also absolute Hypoinsulinämie bei Hyperglykämie, erst kompensatorische Degranulierung,

dann Pyknose und schließlich Verschwinden der B-Zellen. Kinash et al. (41) beschrieben ebenfalls, daß ACTH wie Cortison zu den erwähnten histologischen Erscheinungen führe.

Yoshinaga et al. (93) untersuchten den Zusammenhang von Blutzuckerspiegel und Morphologie der B-Zellen nach Gaben von Cortisonacetat über einen Zeitraum von 50 Tagen und stellten durchaus korrespondierende Werte (s.u.) fest. Auch Volk et al. (91) notieren eine Normalisierung der Cortison-bedingten Hyperglykämie und interpretieren dies dahingehend, daß die Neogenese der B-Zellen den erhöhten Bedarf an Insulin ausgeglichen haben. Andere Untersucher konnten diesen Kompensationsmechanismus nicht bemerken, doch wird eine langfristige Erhöhung des Blutzuckerniveaus allgemein festgestellt (außer Hausberger et al. (33) und Shull et al. (82)).

Wir gebrauchen hier den Ausdruck Langzeiteffekt, da er erst in Anschluß an den insulinotrop-hypoglykämisierenden Effekt mit einer anhaltenden und den Verlauf entscheidend beeinflussenden Hyperglykämie zur Wirkung gelangt.

- ACTH-Zusammenfassung

Bei der Beurteilung unserer Präparate und ihrer Interpretation müssen daher sowohl die kurzfristig wirksam werdenden insulinotropen und anderen endokrinen, wie auch die langfristig zur Wirkung kommenden diabetogen-corticotropen Effekte Berücksichtigung finden.

B. GLUCAGON

Vance et al. (88) berichteten von Versuchen mit isolierten Pankreasinseln - die Versuchstiere waren zuvor adrektomiert -, wo nach ACTH-Gaben (1 IU/ml) eine maximale Freisetzung von immunoreaktivem Glucagon (IRG), jedoch keine signifikanten Veränderungen in der Freisetzung von immunoreaktivem Insulin (IRI) beobachtet wurde. Entsprechend der von Mayhew et al. (64) zitierten Literatur führte auch Cortison in-vitro weder bei IRG noch bei IRI

zu Veränderungen; auch sei eine Freisetzung von IRI durch ACTH erst bei einer höheren Glukosekonzentration (300 mg%) als der hier verwendeten 150 mg% Lösung zu erwarten.

- These

Es erhebt sich hierbei die Frage, ob ACTH via Glucagon die Insulinsekretion stimuliert. Die ACTH-Wirkung wäre dann als extraadrenal zu bezeichnen, da sie ohne Beteiligung der NNR zustande käme.

- A-Zellen Glucagonbildner

Der Nachweis, daß Glucagon in den A-Zellen gebildet wird, wurde erstmals von Gaede et al. (27) geführt. Kracht (43) fand entsprechend eine Kerngrößenverminderung (Inaktivitätsatrophie) der A-Zellen nach Glucagonsubstitution. Cavallero, Foà und Korp und LeCompte werden von Lazarus et al. (49) angeführt, um zu belegen, daß die A-Zellen als Glucagonbildungsstätten anzusehen seien. Kracht (43), Rein-Schneider (75), Vance et al. (89), Bubnova (11) sowie Buchanan et al. (12) benennen allerdings auch intestinale und in den Pankreasausführungsgängen gelegene Glucagon-bildende A-Zellen. Unger et al. (zit. nach Siegenthaler (83)) bemerkten, daß das intestinal gebildete Glucagon (Enteroglucagon) zwar immunologisch wie Glucagon reagiert, ohne biochemisch jedoch dessen Funktion zu erfüllen. Da wir diese Glucagonbildner histologisch nicht berücksichtigen konnten und sie bei in-vivo und teilweise auch bei in-vitro-Versuchen Einfluß nehmen könnten, stellen sie eine mögliche Fehlerquelle für die folgende Diskussion dar.

- Stellung der A-Zellen

Ferner (23) schrieb die Kontrolle der A-Zellen der Hypophyse zu, wobei die B-Zellen sekundär (über die Erhöhung des Blutzuckerspiegels?) zur Hyperfunktion gelangen. Auch Scharff et al. (79) diskutierten die Möglichkeit der Abhängigkeit der A-Zellen von der Hypophyse.

Haist (zit. nach Samols et al. (77)) wiederum beschrieb den Gedanken als naheliegend, daß die A-Zellen auf Grund ihrer juxtazellulären Lage einen direkten Einfluß auf die Insulinsekretion ausüben. Samols et al. (77) hielten es für möglich, daß die Glucagonsekretion zusammen mit Veränderungen des Blutzuckerspiegels die Insulinsekretion bestimme und daß dies evtl. physiologisch bedeutender sei als der bekannte hepatotrope Effekt.

Mayhew et al. (64) schließen einen indirekten Insulinsekretionsmechanismus nicht aus und führen als Beispiel u.a. an, daß Glucagon in-vivo und in-vitro in zahlreichen Untersuchungen eine eindeutige Insulinstimulierung hervorgerufen habe und daher auch in-vitro durchaus die Insulinstimulierung durch Glucagon zustande kommen könne. Vecchio et al. haben diese These postuliert auf Grund ihrer Beobachtungen am entnommenen foetalen Rattenpankreas. Dieses Gewebe scheint keine A-Zellen zu enthalten und sezerniert nur wenig Insulin, wenn in hohen Glucosekonzentrationen incubiert, - es sei denn Glucagon ist ebenfalls anwesend. Bisher sei es nicht möglich festzustellen, ob diese Hypothese haltbar ist (zit. nach Mayhew et al. (64)).

- Glucagon als Insulinstimulans

Während Foà (26) noch nicht klären konnte, ob die der Glucagoninjektion folgende Insulinsekretion dem Glucagon selbst oder der begleitenden Hyperglykämie zuzuschreiben ist - auch Lazarus und Volk (zit. nach Field (24)) führen sie auf die entstehende Hyperglykämie zurück -, wurde Glucagon inzwischen von mehreren Autoren als Insulinstimulus bestätigt: so notierten Samols et al. (77) nach Glucagon-Gaben beim Menschen bereits nach einer Minute eine Erhöhung des IRI, während Blutzuckeränderungen erst zu einem späteren Zeitpunkt auftraten. (Lebovitz et al. (53) beobachteten Blutzuckeränderungen nach ACTH-Gaben erst nach 15 Minuten, bei einem Maximum von 30 Minuten.) Auch Porte (72) zitiert mehrere Untersuchungsergebnisse und nennt Glucagon eines der wirksamsten Insulinstimulantien,

das die Insulinsekretion direkt zu stimulieren scheint. Mayhew et al. (64) führen ebenfalls mehrere Untersucher an und berichten von einer Abhängigkeit der Glucagon-bedingten Insulinstimulierung von der Glukosekonzentration, nennen aber auch anderslautende, glukoseunabhängige Ergebnisse (siehe auch Moskalewski (68)).

Daß für die Glucagon- wie für die Insulinsekretion eine Abhängigkeit von der Glukosekonzentration in Rechnung gestellt werden muß, zeigt auch die Arbeit von Vance et al. (89), wo in-vitro bei niedriger Glukosekonzentration im Medium (30 mg%) ein hoher IRG- und tiefer IRI-Spiegel gemessen wurde. Bei hoher Glukosekonzentration verhielten sich die Hormonspiegel umgekehrt zueinander. - Allerdings kann hier die Dynamik des Stoffwechselgeschehens nur beschränkt herausgelesen werden.

- Glucagon-Zusammenfassung

Es kann daher durchaus erörtert werden, ob ACTH via Glucagon, evtl. in Abhängigkeit von der Blutzuckerkonzentration, die Insulinsekretion stimuliert. Zwischen kurzfristiger insulinotroper und längerfristiger corticotroper Wirkung von ACTH muß jedoch auch weiterhin unterschieden werden.

Im Folgenden sollen unsere Färbeergebnisse unter diesen Gesichtspunkten betrachtet werden.

C. Histologie

a. Corticotrope Wirkung (Langzeit)

ACTH führt auf corticotrope Wege, ebenso wie Cortison, vor allem über eine Steigerung der Glukoneogenese langfristig zu einer Anhebung des Blutzuckerniveaus (diabetogene Wirkung). In beiden Fällen kommt es im Rahmen der Adaption zu Hypertrophie und Hyperplasie der B-Zellen. Die A-Zellen nehmen unter diesen Umständen ab, (Hausberger et al. (34)), wenn auch nicht unbedingt absolut, so doch prozentual zur Inselfläche. Dies dürfte vor allem darauf zurückzuführen sein, daß die Blutzuckerkonzentration der

Hauptstimulus des Insulins ist (Mayhew et al. (64)). So bemerkten Gomori et al. (29) Degranulation und Vakuolisierung der B-Zellen nach Glukoseinfusion. - Aus der auseinanderstrebenden Entwicklung von A- und B-Zellen im Zustand der anhaltenden Hyperglykämie läßt sich daher auf eine sehr geringe Glucagonbeteiligung schließen.

- Folgerungen

Als erste Ergebnisse können daher bereits festgehalten werden:

- Glucagonbildung und -sekretion wird auf corticotropem Wege weder von ACTH noch von Cortison stimuliert.
- Glucagon ist an der insulinstimulierenden Wirkung der Glukose nicht in parallelem Umfang beteiligt.
- Glucagon leistete keinen oder nur einen sehr geringen Beitrag zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels.

Zusammenfassend kann also bisher gesagt werden, daß ACTH auf corticotropem Wege ebenso wie Cortison selbst, weder Insulin noch Glucagon direkt stimulieren, sondern über eine Blutzuckererhöhung sekundär und ohne größere anhaltende Beteiligung von Glucagon eine Insulinsekretion herbeiführen.

b. Extraadrenal-insulinotrope Wirkung

Dem Nachweis der insulinotropen Wirksamkeit von ACTH via Glucagon auf die Insulinsekretion sind auf histologischem Wege naturgemäß Grenzen gesetzt, da es sich um kurzfristige Wirkungen handelt. Dennoch könnten sie am histologischen Substrat abzulesen sein.

- Temporär erhöhte Aktivität der A-Zellen Voraussetzung

Eine Stimulierung der Insulinsekretion via Glucagon "direkt" durch ACTH müßte zur Folge haben, daß nicht nur die B-Zellen überschießend und hypoglykämisierend Insulin ausschütten, sondern daß auch die A-Zellen, zumindest während dieser Zeitspanne, sich in einem Zustand erhöhter funktioneller Aktivität befinden.

- Phloxin-negative Zellen

Bei der Betrachtung unserer Präparate konnten lediglich bei einer einzigen Insel eines einzigen ACTH-Me's konstant und eindeutig über mehrere Färbungen und Schnitte Phloxin-positive, d.h. zweifelsfrei identifizierbare A-Zellen festgestellt werden. Alle anderen nicht mit Aldehyd-Fuchsin (B-Zellen) noch mit Phloxin (A-Zellen) angefärbten Zellen werden im allgemeinen (s.o.) den C-Zellen (Petersson et al. (70)) bzw. D-Zellen zugeordnet. Diese wiederum werden in der histologischen Literatur wechselnd als Vor- oder Endstufen der A- (Bensley, zit. nach Petersson et al. (70)) oder B-Zellen angesehen, da in verschiedenen B-Zellen Vesikeln vom Deltatyp gefunden wurden (Legg (57)). Der Ansicht einiger Autoren, die D-Zellen seien degenerative Zellen, wurde von Caramia (13) widersprochen. Sato et al. (zit. nach Legg (57)), wiederum halten sie für Bildungsstätten eines noch zu entdeckenden Hormons. - Die Struktur der D-Zellen wurde von Lazarus et al. (52) elektronenmikroskopisch als deutlich verschiedenen von A- und B-Zellen beschrieben (siehe auch Lacy (44)). Esterhuizen et al. (19) andererseits konnte keine C-Zellen unterscheiden.

- Folgerung

In Anbetracht der unterschiedlichen und teilweise divergierenden Interpretationen könnte einmal unsere These von der Vermittlerrolle mangels vorhandener Glucagon-bildender A-Zellen als widerlegt angesehen werden, oder aber wir rechnen einen großen Teil der nicht angefärbten Zellen den A-Zellen zu, wobei die prozentual geringer vertretenen C-Zellen (D-Zellen so.) als Fehlerquelle bewußt einbezogen werden.

- Selektivität von Phloxin

In diesem Falle müßte Phloxin nicht nur selektiv für die Färbung der A-Zellen, sondern auch als qualitativ und quantitativ selektiv in der Anfärbung der A-Granula oder eines Glucagon-Äquivalents angesehen werden, ähnlich wie

dies bei der Färbung der B-Zellen mit Aldehyd-Fuchsin der Fall ist. Der Versuch einer solchen Interpretation der Färbeergebnisse mit Phloxin wurde nach unserer Kenntnis in der Literatur bisher nicht unternommen.

In Hinblick auf die sehr gute Selektivität von Phloxin, unter Berücksichtigung der guten Übereinstimmung unserer Färbeergebnisse mit der Literatur (Lazarus et al. (49) und Hausberger et al. (33)) und auch der zellulären Struktur der A-Zellen (s.o.) und ihrer Lokalisation innerhalb der Insel, kann eine qualitative und quantitative Selektivität durchaus angenommen und vertreten werden.

- Konsequenzen der Selektivität von Phloxin

Phloxin-negative Zellen wären demnach als degranulierte A-Zellen anzusehen und ähnlich zu interpretieren wie Foà (26) und Moskalewski (68) dies für die B-Zellen taten: Degranulierung des Zytoplasmas kann einmal Atrophie bedeuten und ein Zeichen von Inaktivität, andererseits aber auch ein Zeichen der erhöhten Funktion, bzw. des erhöhten Umsatzes. Kriterium ist in diesem Falle der Zustand des Zellkerns. Diese waren in unseren Präparaten keineswegs atrophisch oder nekrotisch, oder auch hydropisch hyperplastisch (Hausberger et al. (3) und Bubnova (11)), sondern einheitlich rund, wenn auch bei subjektiver Mikroskopie von geringerer Größe als die der Normal-Me.

c. Zeitliche Parameter

- Versuchsdauer und Tötungszeitpunkt

Weiter muß der Zeitpunkt der Tötung der Versuchstiere, in unserem Versuch 28 Tage nach Untersuchungsbeginn, bei der Interpretation unserer Ergebnisse einbezogen werden. Hier ist vor allem auf die Versuche von Yoshinaga et al. (93) hinzuweisen, wo Ratten mit 40 bis 48 mg/kg Cortisonacetat behandelt wurden, was also unserem corticotropem Langzeiteffekt von ACTH entsprechen würde. Der Blutzuckerspiegel zeigte in diesen Untersuchungen ein erhebliches Ansteigen bis zum 5. Tag und eine sich anschließende

stetige Rückkehr zur Norm, um dann bei weiterer Behandlung wiederum linear anzusteigen. Zahl und Flächeninhalt der Inseln, hier wurden vor allem die B-Zellen untersucht, reagierten kompensatorisch parallel im Verlauf der ersten 25 Tage erst mit Degranulierung (5. Tag), dann mit Hypertrophie, Hyperplasie und Neoplasie, wonach sie dekompensierend ein erneutes, bis zum Versuchsende (50. Tag) weiterführendes Ansteigen des Blutzuckers nicht mehr verhindern können.

Unter Berücksichtigung aller sonstigen Variablen, wie Dosis, Art, etc. können unsere ACTH-Me sehr gut in die Phase der kompensatorischen Normalisierung eingeordnet werden, da die Zeichen der Adaption deutlich ausgeprägt sind, Zeichen einer Dekompensation oder Degeneration jedoch fehlten. Der Blutzucker der Versuchstiere dürfte sich mithin zum Zeitpunkt der Tötung wieder im oder etwas über dem Normbereich befunden haben.

Ebenfalls Berücksichtigung finden muß die Tageszeit, zu der die Tiere getötet wurden: in unserem Fall 24 Stunden nach der letzten ACTH-Gabe, morgens zwischen 9 und 10 Uhr; Futterentzug wurde durchgeführt.

Die Tiere standen also kurz vor der täglichen ACTH-Injektion, die B-Zellen vollbepackt mit Granula, was nach Foà (26) als funktionelle Inaktivität anzusehen ist. Es kann daher durchaus angenommen werden, daß ein normaler, wenn nicht erniedrigter Blutzuckerspiegel vorlag, da nach Lazarow (47) auch bei Abundanz von Inselzellen keine überschüssige Sekretion zu erwarten ist.

- Geschehen nach der Injektion

Mit der Injektion des ACTH wäre also eine insulinotrop induzierte Insulinausschüttung mit folgender Hypoglykämie zu erwarten. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Normalisierung und entsprechend der reaktiven NNR-Aktivität zu einer Hyperglykämie. Letztere wiederum führt zur Insulinausschüttung, die dann allerdings nicht im Zusammenhang mit Glucagon zu sehen ist.

- Hypothetischer Versuchsverlauf

Der Versuchsverlauf könnte also so rekonstruiert werden: Die täglichen ACTH-Gaben führen im Laufe der ersten Woche zu einer starken Hyperglykämie, der sich die B-Zellen kaum gewachsen zeigen und die bei ihnen zur Degranulierung führt. Die A-Zellen führen zwar auch weiterhin die durch ACTH auf insulinotropem Wege ausgelöste Insulinsekretion herbei, sind jedoch im weiteren Tagesverlauf nicht beansprucht, da einmal der Blutzucker aus anderer Quelle gespeist wird (NNR) und zum anderen sich im Tagesdurchschnitt als deutlich erhöht erweist. Die A-Zellen unterliegen daher zumeist einer gewissen Inaktivität, die B-Zellen einer Hyperaktivität.

Während der folgenden zwei Wochen kompensieren die B-Zellen die Hyperglykämie mehr und mehr durch Hypertrophie, Hyperplasie und Inselneogenese. Die A-Zellen sind während dieser Zeit weiterhin hepatotrop-glykogenolytisch kaum aktiv und werden erst mit Rückkehr der sich anschließenden Normglykämie wieder belastet.

Phloxin-negative Zellen können daher in Hinblick auf die zur Norm zurückgekehrte Blutzuckergesamtlage und die damit mögliche morgentliche Hypoglykämie durchaus als degranulierte A-Zellen angesehen werden!

Im weiteren Verlauf müßte sich nach Yoshinaga et al. (93) bei ausreichend hoher Medikation der Blutzuckerspiegel wieder erhöhen und zur Inseldekompensation führen.

D. Zusammenfassung

Wir haben an Hand von endokrinologischen und histologischen Untersuchungsergebnissen gezeigt, daß ACTH auf corticotropem Wege weder Insulin noch Glucagon direkt stimuliert, sondern sekundär über die Erhöhung des Blutzuckerspiegels ohne größere anhaltende Glucagonbeteiligung die Insulinsekretion herbeiführt.

Bei entsprechender Interpretation der Anfärbung der A-Zellen mit Phloxin und unter Berücksichtigung des Versuchs-

verlaufs kann die Präsenz von A-Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraums angenommen werden. Damit läßt sich die insulinotrope ACTH-Wirkung via Glucagon mit dem histologischen Bild in Einklang bringen. Da es sich bei der insulinotropen Wirkung von ACTH um einen kurzfristigen Effekt handelt, dessen Nachweis vorwiegend auf endokrino- und immunologischem Gebiet zu erbringen ist, sind unsere histologischen Resultate nur bedingt aussagekräftig.

S Y N O P S I S

- Ambivalente Glucagonwirkung

Gomez-Acebo et al. (zit. nach Siegenthaler (83)), gelangen bei der Beschreibung der Glucagonfunktion zu folgendem Ergebnis: ob Glucagon für die Glukosehomöostase erforderlich ist oder ob es lediglich Notfallfunktion besitzt, ist noch nicht geklärt. - Unter Umständen kann die Diskussion vereinfacht werden, wenn man für die Glucagonwirkung, ähnlich wie wir dies für ACTH aufteilten, einen langfristigen von einem kurzfristigen Verlauf unterscheidet, wobei für beide Formen die Abhängigkeit vom Blutzuckerniveau zu berücksichtigen wäre.

Kurzfristig kommt es bei akuter Hypoglykämie zur Glucagonausschüttung mit folgender Leberglykogenolyse und -glukoneogenese (Buchanan et al. (12)). Andererseits führt in-vitro eine erhöhte Glukosekonzentration im Medium dazu, daß eine quantitativ geringere Glucagonbeimengung eine Insulinsekretion initiiert (Turner und McIntyre, zit. nach Mayhew et al. (64)).

Der Höhe des Blutzuckerspiegels scheint offenbar eine Schlüsselrolle zuzukommen, die die Erklärung dafür bietet, daß "Glucagon nicht nur indirekt - über den Glukoseanstieg - sondern auch direkt die Insulinsekretion stimuliert" (Siegenthaler (88)). Es wäre daher evtl. möglich, die (kurzfristige) Glucagonwirkung wie folgt darzustellen: im Zustand der Hypoglykämie besitzt Glucagon eine hepatotrope und keine oder eine sehr geringe insulinotrope Wirksamkeit; bei Hyperglykämie verfügt es bei quantitativ geringerer Sekretion über keine oder eine sehr geringe hepatotrope, aber über eine intensive insulinotrope Wirkung.

Daß dieser Wirkungsmechanismus nicht nur als Notfallfunktion bei extremen Blutzuckersituationen zum Einsatz gelangt und daß der Übergang in der Wirkung auf die beiden diskutierten Zielorgane dabei durchaus fließend verlaufen könnte, lassen die Arbeiten von Samols et al. (77) und Porte (72) vermuten. Trotz leicht verschiedener Applika-

tion von Glucagon und Formulierung ihrer Ergebnisse stellten sie fest, daß eine erste Glucagongabe zu einem Ansteigen des Blutzuckerspiegels führt, eine sich anschließende zweite Gabe bei gleichbleibend erhöhtem Blutzuckerniveau die Insulinsekretion erhöht.

Bei langfristig bestehender Hypoglykämie nach exogener Insulinzufuhr bemerkten Logothetopoulos et al. (59) und auch Lazarus et al. (52) keine Veränderungen der A-Zellen. Logothetopoulos et al. (59) hielten daher ihre kompensatorische Funktion bei Insulin-bedingter Hypoglykämie für nicht sehr erheblich. Buchanan et al. (12) führten eigene Untersuchungen an, bei denen nach durch Futterentzug bedingter Hypoglykämie ein Sinken sowohl des Insulin- wie auch des Glucagonspiegels gemessen werden konnte (allerdings konnte zwischen pankreatischem und intestinalem Glucagon nicht unterschieden werden). Als Grund nehmen sie an, daß nach Long et al. die Leberglykogenreserven im Hungerzustand rasch aufgebraucht und das Muskelglykogen die hauptsächliche Kohlehydratquelle sei.

Eine langfristige Hyperglykämie, wie sie für unsere Versuche anzunehmen ist, dürfte wohl, wie wir zeigen konnten, ebenfalls ohne begleitende hepatotrope Glucagonbeteiligung verlaufen. - Die von Scharff et al. (79) beschriebene relative und absolute Abundanz der A-Zellen zusammen mit NNR-Hyperplasie nach contrainsulärer Behandlung mit Alloxan und gleichzeitiger Hyperglykämie ist ebenso wie ähnliche Beobachtungen von Lazarus et al. (51) nach sehr hohen und sofort zur Dekompensation führenden Cortisondosen nur scheinbar widersprüchlich und erklärt sich von selbst, wenn sie als Ergebnis des Versuchs einer andauernden kurzfristigen Stimulierung der Insulinsekretion bei bestehender Insulinmangelhyperglykämie angesehen wird. Hier wäre auch eine, sozusagen ungewollte, Glucagon-bedingte Blutzuckererhöhung, zumindest bis zur Erschöpfung der Leberglykogenreserven, als Ausdruck eines circulus vitiosus denkbar.

Allgemein können wir aber für langfristige extreme Blutzuckersituationen feststellen, daß hier keine anhaltende Glucagonaktivität anzunehmen ist. Vielmehr ist Glucagon vorwiegend kurzfristig wirksam. Eine ambivalente Wirkungsweise in Abhängigkeit von der Blutzuckerkonzentration, d.h. als Insulinstimulans bei Hyperglykämie und glykogenolytisch wirksames Agens, wäre vorstellbar, z.B. als Notfallreaktion, was jedoch einen Beitrag zur physiologischen Blutzuckerhomöostase nicht ausschließt.

- ACTH

Argumente für die Möglichkeit einer insulinotropen ACTH-Wirkung via Glucagon haben wir bereits ausführlich erörtert. Durch die Diskussion einer ambivalenten Glucagonwirkung scheinen sie zumindest teilweise, d.h. für den normo- und hyperglykämischen Bereich, bestätigt und präzisiert. Es ergibt sich die Frage, ob die von uns aufgestellte These nicht dahingehend zu erweitern ist, daß ACTH auf insulinotropem Wege zu einer Glucagonausschüttung führt, die in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel vor allem eine Insulinsekretion, bzw. vor allem eine Leberglykogenolyse in Gang setzt. Hierzu bedarf es allerdings noch zahlreicher gezielter Untersuchungen über die Wechselwirkungen von ACTH, sowie Glucagon- und Insulinsekretion und deren Abhängigkeit vom Blutzuckerniveau.

- Biochemische Wirkungsweise

Nicht geklärt bleibt ebenfalls der biochemische Verlauf einer Insulinstimulierung durch ACTH "via", d.h. unter aktiver oder passiver Beteiligung von Glucagon. Ein Eingehen auf diese Frage übersteigt den Rahmen der uns gegebenen Möglichkeiten. - Ein möglicher Beitrag könnte darin bestehen, daß bei der Stimulierung der Insulinsekretion nicht ACTH (und TSH) und Glucagon auf die Adenylcyclase einwirken (Malaisse et al. (60)), sondern ACTH auf Glucagon und dieses auf die Adenylcyclase. Dann wäre Glucagon als "first messenger" für die Insulinsekretion (Suther-

land et al. (85)) - und in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel evtl. für die Leberglykogenolyse - zu verstehen.

- Physiol. Stoffwechsel

Ebenso offengelassen werden muß die Frage, ob und inwiefern die von uns erörterten ACTH-Wirkungen Teil des physiologischen Stoffwechselgeschehens sind, ob sie lediglich Notfallfunktion besitzen oder auch in die Glukosehomöostase eingreifen. Siegenthaler (83) nimmt an, daß die durch ACTH auf extraadrenalem Wege herbeigeführte Steigerung der Insulinsekretion wahrscheinlich keine pathophysiologische Bedeutung hat.

- Andere Faktoren

Um die Anzahl der Veränderlichen auch innerhalb der Diskussion nicht ausufern zu lassen, konnte auf zahlreiche andere auf die Langerhans'schen Inseln einwirkenden Faktoren nicht näher eingegangen werden: So auf die Rolle des Vegetativums, oder auf das TSH, das nach Scharff et al. (79) mit dem Regelkreis des Inselorgans vermascht ist und dem Mayhew et al. (64) ebenfalls einen "direkten" Effekt auf die Insulinsekretion zuschreiben.

Gleichfalls unberücksichtigt blieb die Rolle des Adrenalins, das bei einigen Tierarten (Sarcione et al (78) und Scian et al (80)) und möglicherweise beim Menschen (Lawrence et al. (45)) durch Glucagon stimuliert wird und seinerseits sowohl einen direkten Effekt auf die periphere Glukoseutilisierung ausübt als auch die Insulinsekretion reduziert (Porte et al. (71), siehe auch Samols et al. (77), Mayhew et al. (64) und Moskalewski (68)). Noch unübersichtlicher wird das Bild, wenn im Stress die Notfallfunktion des NNM's u.a. zu einer Stimulierung der HVL- bzw. ACTH-Sekretion führt (Cannon 1914, zit. nach Siegenthaler (83)), bzw. umgekehrt ACTH-Gaben zu einer Vergrößerung der Adrenalin-bildenden Zellen des NNM führen (Merkle et al. (65)).

Unsere Arbeit kann daher nur als Versuch gewertet werden, einen Teilaspekt der endokrinen Wechselwirkung von ACTH, Glucagon und Insulin unter Einbeziehung und besonderer Berücksichtigung des histologischen Pankreasbildes wiederzugeben. Weitere Untersuchungen erscheinen notwendig, um die Wirkungen von ACTH und Glucagon innerhalb der Blutzuckerregulierung zu präzisieren. Eventuell wird sich eine Neuinterpretation der Inselzellen als notwendig erweisen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

I. FÄRBUNG

Vor allem die von uns benutzte Dreifachfärbung nach Maske (63) modifiziert, hat sich bei der Anfärbung der Pankreas-schnitte gut bewährt. Die B-Zellen und ihre Granulierung kamen ausgezeichnet zur Darstellung. Mit Phloxin angefärbte A-Zellen waren bei den mit ACTH behandelten Versuchstieren nur in einer einzigen Insel sicher zu identifizieren. Dies wurde von uns dahingehend interpretiert, daß die Anfärbung mit Phloxin eventuell ähnlich qualitativ und quantitativ selektiv ist, wie die der B-Granula mit Aldehyd-Fuchsin.

Die Hämalaun-Phloxin-Färbung war färberisch einfacher zu handhaben, setzte jedoch die Anwesenheit anfärbbarer A-Zellen voraus und gibt keinen Aufschluß über die Intensität der Granulierung der B-Zellen. Insofern war sie innerhalb unserer Versuche nur von beschränkter Aussagekraft.

II. VERSUCHSTIERE

Unsere Befunde am mit Cortison vorbehandelten Pankreas sind entsprechend der relativ geringen Cortisondosierung von 15 mg/kg/die und im Einklang mit der Literatur nur wenig ausgeprägt.

Die histologischen Ergebnisse nach ACTH-Gaben sind mit ihren auch von anderen Autoren beschriebenen Erscheinungen der Hypertrophie, Hyperplasie der B-Zellen und Neogenese von Inseln Ausdruck eines Stadiums der kompensatorischen Normalisierung.

Bei der ACTH-Wirkung muß zwischen einer vor allem langfristig wirksam werdenden corticotropen (hyperglykämisierenden) und einer kurzfristig wirkenden extraadrenalinotropen (hypoglykämisierenden) unterschieden werden.

Die Arbeit von Vance (68), die beim inkubierten Rattenpankreas nach ACTH-Gaben eine prompte Erhöhung der Frei-

setzung von immunoreaktivem Glucagon jedoch keine Änderung des immunoreaktiven Insulins feststellte, war Anlaß für die Erörterung der These, daß ACTH unter Beteiligung von Glucagon die Insulinsekretion stimuliert.

Wir haben an Hand von endokrinologischen und histologischen Untersuchungsergebnissen gezeigt, daß ACTH auf corticotropem Wege weder Insulin noch Glucagon direkt stimuliert, sondern sekundär über die Erhöhung des Blutzuckerspiegels ohne größere anhaltende Glucagonbeteiligung die Insulinsekretion herbeiführt.

Bei entsprechender Interpretation der Anfärbung der A-Zellen mit Phloxin und unter Berücksichtigung des Versuchsverlaufs kann die Präsenz von A-Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraums angenommen werden. Damit läßt sich die insulinotrope ACTH-Wirkung via Glucagon mit dem histologischen Bild in Einklang bringen. - Da es sich bei der insulinotropen Wirkung von ACTH um einen kurzfristig wirksam werdenden Effekt handelt, dessen Nachweis vorwiegend auf endokrino- und immunologischem Gebiet zu erbringen ist, sind unsere Resultate nur bedingt aussagekräftig.

Für langfristig extreme Blutzuckersituationen wurde festgestellt, daß keine anhaltende Glucagonaktivität anzunehmen ist. Glucagon ist vielmehr vorwiegend kurzfristig wirksam. Hierbei wäre vorstellbar, daß Glucagon über eine ambivalente Wirkungsweise verfügt, d.h. als Insulinstimulans bei Hyperglykämie und als glykogenolytisches Agens bei Hypoglykämie wirksam wird.

L I T E R A T U R L I S T E

1. ANDERSON, E. und LONG, J.A.: The effect of Hyperglycemia on insulin secretion as determined with the isolated rat pancreas in a perfusion apparatus. *Endocrinology* 40 (1947), 92-97.
2. ANDERSSON, A., HELLERSTRÖM, C. und PETERSSON, B.: Phase-contrast-microscopy of fresh and cultured pancreatic islet cells of guinea pigs. *Z. Zellforsch.* 82 (1967) 110-117.
3. ANSELMINO, K.J. und HOFFMANN, F.: Über den pankreatotropen (insulindropen) Wirkstoff des Hypophysenvorderlappen. *Dtsch. med. Wschr.* 91 (1966), 1401-1405.
4. ARNOLD, A.: Beitrag zur quantitativen Histologie des Alloxandibabetes der Albinoratte: Die Kerngrößen der Inselzellen. *Acta anat.* 12 (1951) 396-428.
5. ARNOLD, M.: *Histochemie*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968).
6. BENCOSME, S.A.: Studies on the methods of staining the islet cells of the pancreas. *Arch. Path.* 53 (1952) 87-97.
7. BENCOSME, S.A. und PEASE, D.C.: Electron microscopy of the pancreatic islets. *Endocrinology* 63 (1958) 1-13.
8. BENCOSME, S.A. und MARTINEZ-PALOMO, A.: Formation of secretory granules in pancreatic islet B-cells of cortisone-treated rabbits. *Lab. Invest.* 18 (1968) 746-756.
9. BOCK, R.: Über die Darstellbarkeit ^{ur}neosekretorischer Substanz mit Chromalaun-Gallocyanin im supraoptico-hypophysären System beim Hund. *Histochemie* 6 (1966) 362-369.
10. BOCK, R. und ULLMANN, H.: Zur Darstellung der B-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Hundes und der Ratte mit Chromalaun-Gallocyanin. *Acta histochem.* 27 (1967) 70-73.
11. BUBNOVA, N.B.: Condition of a-cells of the islets of the pancreas in children in various diseases and in connection with hormone therapy. *Ark. Patol.* 30 (1968) 52-58.
12. BUCHANAN, K.D., VANCE, J.E. und WILLIAMS, R.H.: Effect of starvation on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Metabolism* 18 (1969) 155-161.

13. CARAMIA, F.: Electron microscopic description of a third cell type in the islets of the rat pancreas. *Am. J. of Anat.* 112 (1963) 53-64.
14. CARAMIA, F., MUNGER, B.L. and LACY, P.E.: The ultrastructural basis for the identification of cell types in the pancreatic islets. *Z. Zellforsch.* 67 (1965) 533-546.
15. COORE, H.G. und RANDLE, P.J.: Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem. J.* 93 (1964) 66-78.
16. DeBODO, R.C. und ALTSZULER, N.: The anterior pituitary and carbohydrate metabolism. In: *Clinical Endocrinology*, Vol. I, ed. by Astwood, E.B., Grune and Stratton, New York (1960) 19-35.
17. ENGEL, F.L., FREDERICKS, J., LOPEZ, E. und ALBERTSON, T.: Some extraadrenal actions of corticotropin on carbohydrate metabolism in the rat. *Endocrinology* 63 (1958) 768-777.
18. ENGEL, F.L.: Extra-adrenal actions of adrenocorticotropin. *Vitamins Hormones* 19 (1961) 189-227.
19. ESTERHUIZEN, A.C. und LEVER, J.D.: Pancreatic islet cells in the normal and CoCl_2 -treated guinea pig. A fine structural study. *J. Endocr.* 23 (1961) 243-252.
20. ESTERHUIZEN, A.C., SPRIGGS, T.C.B. und LEVER, J.D.: Nature of islet-cell innervation in the cat pancreas. *Diabetes* 17 (1968) 33-36.
21. FALCK, B. und HELLMANN, B.: A fluorescent reaction for monoamines in the insulin producing cells of the guinea pig. *Acta Endocrinol.* 45 (1964) 133-138.
22. FERNER, H.: *Das Inselssystem des Pankreas*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1952).
23. FERNER, H.: *Anatomie des Nervensystems und der Sinnesorgane des Menschen*. München-Basel (1967).
24. FIELD, J.B.: Factors concerned with insulin synthesis and release. *Metabolism* 13 (1964) 407-421.
25. FISHER, E.R. und HASKELL, A.E.: Combined Gomori methode for demonstration of pancreatic alpha and beta cells. *Am. J. Clin. Path.* 24 (1954) 1433-1434.
26. FOA, P.P.: Secretory activity of islets of Langerhans. In: *Ciba Foundation Colloquia*, Nr. 9 (1956) 56ff.
27. GAEDE, K., FERNER, H. und KASTRUP, H.: Über das zweite Kohlenhydratstoffwechselhormon der Bauchspeicheldrüse (Glucagon) und seine Herkunft aus dem alpha-Zellensystem. *Klin. Wschr.* 28 (1950) 388-393.

28. GENUTH, S. und LEBOVITZ, H.E.: Stimulation of insulin release by corticotropin. *Endocrinology* 76 (1965) 1093-1099.
29. GOMORI, G., FRIEDMAN, N.B. und CALDWELL, D.W.: Beta cell changes in guinea pig pancreas in relation to blood sugar level. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 41 (1939) 567-570.
30. GOMORI, G.: Aldehyde-fuchsin: new stain for elastic tissue. *Amer. J. Clin. Path.* 20 (1950) 665-666.
31. GRIES, F.A. und BETHGE, A.: A comparison of the lipolytic effects of beta 1-24-corticotropin and extracted porcine ACTH. *Metabolism* 16 (1967) 967-976.
32. HARTROFT, W.S. und WRENSHALL, G.A.: Correlation of beta-cell granulation with extractable insulin of the pancreas. *Diabetes* 4 (1955) 1-7.
33. HAUSBERGER, F.X. und RAMSAY, A.J.: Steroid diabetes in guinea pigs. *Endocrinology* 53 (1953) 423-435.
34. HAUSBERGER, F.X. und RAMSAY, A. J.: Islet hypertrophy in obesity of mice bearing ACTH-secreting tumors. *Endocrinology* 65 (1959) 165-171.
35. HELLERSTRÖM, C. und HELLMAN, B.: Reactions of the two types of A-cells in the islets of Langerhans after administration of glucagon. *Acta endocr.* 41 (1962) 116-122.
36. HELLMAN, B. und HELLERSTRÖM, C.: Size differences of the B-cell nuclei in the islet tissue of normal and alloxan-treated rats. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 45 (1959) 113-122.
37. HELLMAN, B. und PETERSSON, B.: The activity of the islet B-cells as indicated by the nuclear and nucleolar size in the American obese-hyperglycemic mice. *Acta Path. Microbiologica Scand.* 50 (1960) 291-296.
38. HELLMAN, B.: Nuclear differences between the argyrophil (=A₁) and non-argyrophil (=A₂) pancreatic A-cells in the duck. *Acta Endocrinol.* 36 (1961) 603-608.
39. IVIČ, M.: Neue selektive Färbungsmethode der A- und B-Zellen der Langerhans'schen Inseln. *Anat. Anz.* 107 (1959) 347-350.
40. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 6. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967).
41. KINASH, B. und HAIST, R.E.: The effect of ACTH and of cortisone on the islets of Langerhans and the pancreas in intact and hypophysectomized rats. *Am. J. of Physiol.* 178 (1954) 441-444.

42. KITABCHI, A.E., BUCHANAN, D.D., VANCE, J.E. und WILLIAMS, R.H.: Effect of adrenocorticotropin and glucocorticoids on insulin secretion, *J. Clin. Endocrin.* 28 (1968) 1479-1486.
43. KRACHT, J.: Morphologische Kriterien zur Beurteilung der Inselaktivität. *Endokrinologie* 36 (1958) 146-158.
44. LACY, P.E.: Electron microscopy of the normal islets of Langerhans. *Diabetes* 6 (1957) 498-507.
45. LACY, P.E.: The pancreatic beta cell. *New Eng. J. Med.* 276 (1967) 187-195.
46. LAWRENCE, A. M. und FORLAND, M.: Glucagon provocative test for pheochromocytoma, *J. Lab. Clin. Med.* 64 (1964) 878.
47. LAZAROW, A.: Insulin and glucagon secretion. In: Williams, R.H. ed.: *Diabetes with a chapter on hyperglycemia*. Hoebner, New York (1959) 29-45.
48. LAZARUS, S.S. und BENCOSME, S.A.: Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 89 (1955) 114-118.
49. LAZARUS, S.S. und VOLK, B.W.: The effect of protracted glucagon administration on blood glucose and on pancreatic morphology. *Endocrinology* 63 (1958) 359-371.
50. LAZARUS, S.S.: A combined periodic acid-Schiff trichrome stain. *Arch. Pathol.* 66 (1958) 767-772.
51. LAZARUS, S.S., BENCOSME, S.A. und VOLK, B.W.: Pancreatic adaption to diabetogenic hormones. *Arch. Path.* 67 (1959) 112/456-123/467.
52. LAZARUS, S.S., SHAPIRO, S. und VOLK, B.W.: Secretory granule formation and release in rabbit pancreatic A-cells. *Diabetes* 17 (1968) 152-162.
53. LEOVITZ, H.E. und ENGEL, F.L.: Relationships between the structure and biological activities of corticotropin and related peptides. *Metabolism* 13 (1964) 1230-1246.
54. LEOVITZ, H.E. und ENGEL, F.L.: In vivo and in vitro adipokinetic effects of corticotropin. In: *Handbook of Physiology - Adipose Tissue* (1965) USA, 541-547.
55. LeCOMPTE, P.M.: Pathologic anatomy of the pancreas in diabetes mellitus. In: Williams, R.H. ed.: *Diabetes with a chapter on hyperglycemia*. Hoebner, New York (1959) 309-324.

56. LEDER, E.D.: Der Blutmonocyt. Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik, Bd. 23. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967).
57. LEGG, P.G.: The fine structure and innervation of the beta and delta cells in the islet of Langerhans of the cat. Z. Zellforsch. 80 (1967) 307-327.
58. LEVER, J.D. und FINDLAY, J.A.: Similar structural bases for the storage and release of secretory material in adrenomedullary and B pancreatic cells. Z. Zellforsch. 74 (1966) 317-324.
59. LOGOTHETOPOULOS, J., KRAICER, J. und BEST, C.H.: Granulation and reactive zinc in the cells of the islets of Langerhans. Effect of prolonged insulin treatment. Diabetes 10 (1961) 367-374.
60. MALAISSE, W.J., MALAISSE-LAGAE, F. und MAYHEW, D.: A possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion. J. Clin. Invest. 46 (1967) 1724-1734.
61. MANCINI, A.M. und DONTENWILL, W.: Die Wirkung der Steroidhormone auf die Morphokinese des Pankreas. Endokrinologie 34 (1957) 146-155.
62. MASKE, H.: Beobachtungen über das Zink in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas und seine Beziehungen zur Inseln-funktion. Z. f. Naturf. 8b (1953) 96-104.
63. MASKE, H.: Eine neue Methode zur Darstellung der A- und B-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Klin. Wschr. 33 (1955) 1058.
64. MAYHEW, D.A., WRIGHT, P.H. und ASHMORE, J.: Regulation of insulin secretion. Pharmacol. Rev. 21 (1969) 183-212.
65. MERKLE, U. und BLÜMEL, J.: Histologische und karyometrische Studie am Nebennierenmark nach ACTH-Gaben. Z. mikrosk.-anat. Forsch. 81 (1970) 374-386.
66. MILNER, R.D.G. und HALES, C.N.: Cations and the secretion of insulin. Biochem. Biophys. Acta 150 (1968) 165-167.
67. MOHNIKE, G., HOLLE, G. und MORITZ, V.: Untersuchungen am Inselorgan der weißen Maus: Mitteilungen I bis IV. Endokrinologie 43 (1962) 166-197.
68. MOSKALEWSKI, S.: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen. Com. Endocrinol. 5 (1965) 342-353.

69. NEY, R.L., DEXTER, R.N., DAVIS, W.W. und GARREN, L.D.: A study of the mechanisms by which adrenocorticotrophic hormone maintains adrenal steroidogenic responsiveness. *J. Clin. Invest.* 46 (1967) 1916-1923.
70. PETERSSON, B. HELLERSTRÖM, C. und HELLMAN, B.: Some characteristics of the two types of A-cells in the islets of Langerhans of guinea pigs. *Z. Zellforsch.* 57 (1962) 559-566.
71. PORTE, D., GRABER, A., KUZUYA, T. und WILLIAMS, R.H.: Epinephrine inhibition of insulin release (abstract). *J. Clin. Invest.* 44 (1965) 1087.
72. PORTE, D.Jr.: Beta adrenergic stimulation of insulin release in man. *Diabetes* 16 (1967) 150-155.
73. RANDLE, P.J.: Pituitary growth hormone and blood insulin activity. *Ciba Foundation Colloquia*, Nr. 9 (1956) 35ff.
74. RANDLE, P.J.: In: *Hormones in blood*. Herausgeber Cray, C.B. und Bacharach, A.L., Academic Press. London (1961) 11.
75. REIN-SCHNEIDER: Einführung in die Physiologie des Menschen. 13./14. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960).
76. ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. 16. Aufl., R. Oldenbourg Verlag, München-Wien (1968).
77. SAMOLS, E.G., MARRI, G. und MARKS V.: Inter-relationship of glucagon, insulin and glucose. Insulinogenic effect of glucagon. *Diabetes* 15 (1966) 855-866.
78. SARCIONE, E.J., BACK, N. SOKAL, J.E., MEHLMANN, E. und KNOBLOCK, E.: Elevation of plasma epinephrine levels produced by glucagon in vivo. *Endocrinology* 72 (1963) 523-526.
79. SCHARFF, J.-H., HAMMER, R., LEUTERITZ, W., SCHMIDT, W. und MARZOTKO, D.: Verteilung der A- und D-Zellen sowie des Inselquotienten nach contrainsulärer, antihyroidaler und antadenophysärer Behandlung im Inselorgan der weißen Ratte. *Z. Zellforsch.* 69 (1966) 659-685.
80. SCHIEBLER, T.H. und SCHIESSLER, S.: Über den Nachweis von Insulin mit den metachromatisch reagierenden Pseudoisocyaninen. *Histochemie* 1 (1959) 445-465.
81. SCIAN, L.F., WESTERMANN, C.D., VERDESCA, A.S. und HILTON, J.G.: Adrenocortical and medullary effects of glucagon. *Am. J. of Physiol.* 199 (1960) 867-870.

82. SHULL, K.H. und MAYER, J.: Analysis of the blood sugar response of obese hyperglycemic mice and normal mice to hormones: growth hormone, cortisone, and corticotropin. *Endocrinology* 58 (1956) 1-7.
83. SIEGENTHALER, W.: *Klinische Pathophysiologie*. 1. Auf. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970).
84. SUSSMAN, K.E. und VAUGHAN, G.D.: Insulin release after ACTH, glucagon and adenosine-3'5'-phosphate (cyclic AMP) in the perfused isolated rat pancreas. *Diabetes* 16 (1967) 449-454.
85. SUTHERLAND E.W. und ROBINSON, G.A.: The role of cyclic 3',5'-AMP in response to catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.* 18 (1966) 145-161.
86. TÄLJEDAL, I.B., HELLMAN, B. und HELLERSTRÖM, C.: Quantitative studies on isolates pancreatic islets of mammals: adenosine triphosphatase activity in normal and obese-hyperglycemic mice. *J. Histochem. Cytochem.* 12 (1964) 491-496.
87. TELIB, M.: Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von Monosacchariden und Hormonen auf die Insulinsekretion des isolierten Pankreasgewebes einiger Säugetiere und des Frosches. *Z. Ges. Exp. Med.* 147 (1968) 316-332.
88. VANCE, J.E., KITABCHI, A.E., BUCHANAN, K.K. und WILLIAMS, R.H.: Effect of pituitary and adrenal hormones on glucagon and insulin release from isolated islets of Langerhans. *Clin. Res.* 16 (1968) 354.
89. VANCE, J.E. BUCHANAN, K.D., CHALLONER, D.R. und WILLIAMS, R.H.: Effect of glucose concentration on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetes* 17 (1968) 187-193.
90. VOLK, B.W. und LAZARUS, S.S.: Effect of adrenalin on blood glucose and pancreatic morphology. *Endocrinology* 65 (1959) 586-593.
91. VOLK, B.W., LAZARUS, S.S. und WELLMAN, K.F.: Beta cell structure in latent and chronic diabetes of the rabbit. *Diabetes* 14 (1965) 792-804.
92. WELLMANN, K.F., VOLK, B.W. und LAZARUS, S.S.: Ultrastructural pancreatic beta-cell changes in rabbits after small and large doses of alloxan. *Diabetes* 16 (1967) 242-251.
93. YOSHINAGA, T., KATAYAMA, T., NAKAJIMA, I. und NISHIKAWA, M.: Einfluß von Glukocorticoiden auf die Langerhans'schen Inseln der Ratte. *Endokrinologie* 51 (1967) 211-223.

Herrn Professor Dr. U. Merkle danke ich für die
Überlassung des Themas und seine Beratung bei der
Ausarbeitung der Dissertation.

Am 2. März 1945 wurde ich, Harald Hoffmann, als erster Sohn des Regierungsveterinärrates Dr. Robert Hoffmann und seiner Ehefrau Hermine, geb. Schmitz, in Karlsbad/CSSR geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Traunstein. Die ersten drei Gymnasialjahre verbrachte ich im Benediktinerinternat Metten. Von 1958 bis zum Schulabschluß 1965 besuchte ich - unterbrochen durch einen einjährigen Aufenthalt in den USA im Rahmen des Austauschprogramms des American Field Service - das Fridericianum in Erlangen.

Im Anschluß an den zwölfmonatigen Wehrdienst begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Hier legte ich im August 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im März 1969 die ärztliche Vorprüfung ab und bestand im Februar 1973 das medizinische Staatsexamen.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990